



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Anja Mikolić

**UČINAK KADMIJA NA FUNKCIJE  
POSTELJICE U PRIJENOSU  
ESENCIJALNIH MIKROELEMENATA  
I SINTEZI STEROIDNIH HORMONA  
U ŠTAKORICA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Anja Mikolić

**THE EFFECT OF CADMIUM  
ON PLACENTAL FUNCTIONS  
IN TRANSPORT OF ESSENTIAL  
MICROELEMENTS AND STEROID  
HORMONE SYNTHESIS IN RATS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Anja Mikolić

**UČINAK KADMIJA NA FUNKCIJE  
POSTELJICE U PRIJENOSU  
ESENCIJALNIH MIKROELEMENATA  
I SINTEZI STEROIDNIH HORMONA  
U ŠTAKORICA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

dr. sc. Martina Piasek, dr. med., znan. savj. u tr. zv.

Zagreb, 2015.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Anja Mikolić

**THE EFFECT OF CADMIUM  
ON PLACENTAL FUNCTIONS  
IN TRANSPORT OF ESSENTIAL  
MICROELEMENTS AND STEROID  
HORMONE SYNTHESIS IN RATS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Martina Piasek, PhD, MD, Senior Researcher, Sci. Advisor

Zagreb, 2015

Ovaj doktorski rad je izrađen u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, u okviru znanstvenoistraživačkog projekta MZOŠ/MZOS „Izloženost metalima i njihovi učinci u graviditetu i postnatalnom razdoblju“ (br. 022-0222148-2135, voditeljica projekta Martina Piasek).

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja znanstvenog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicina i zdravstvo, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

*Najljepše zahvaljujem mojoj mentorici dr. sc. Martini Piasek, dr. med., znan. savj. u tr. zv. na svoj pomoći i korisnim savjetima tijekom izrade i pisanja ovog rada i usmjeravanju mojih prvih koraka u znanstvenoistraživačkom radu, razumijevanju i podršci.*

*Posebno zahvaljujem dr. sc. Jasni Jurasović, znan. savj., predstojnici Jedinice za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam, na brojnim vrijednim savjetima i pomoći u analizama elemenata i podršci.*

*Velika hvala dr. sc. Vedi Mariji Varnai, dr. med., spec. med. rada, znan. savj. na nesebičnoj pomoći u cjelokupnoj statističkoj obradi podataka.*

*Zahvaljujem dr. sc. Saši Kralik Oguić, spec. med. biokem. na suradnji tijekom provođenja analiza steroidnih hormona u Kliničkoj jedinici za laboratorijsku endokrinologiju KBC Zagreb.*

*Toplo i iskreno zahvaljujem dr. sc. Ireni Brčić Karačonji, dipl. ing. med. biokem., znan. sur. na pomoći u analizama steroidnih hormona kao i svim vrijednim prijateljskim savjetima i sugestijama, strpljenju i podršci u svakome trenutku.*

*Zahvaljujem se gospođi Snježani Mataušić, farm. tehn. na svoj pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela istraživanja, posebno na podršci prilikom rada s laboratorijskim životinjama.*

*Dragoj kolegici Antoniji Sulimanec Grgec, mag. nutr. velika hvala na prijateljstvu, podršci i uvijek spremnoj pomoći. Mojim „južnim kolegicama“ zahvaljujem na uvijek toploj dobrodošlici i što su dijelile sa mnom jednako trenutke smijeha i suza.*

*Iskreno zahvaljujem svim suradnicima Jedinice za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam kao i svim kolegama i suradnicima Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu koji su mi na bilo koji način pomogli i pridonijeli nastanku ovoga rada.*

*Hvala mojim roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi, povjerenju, razumijevanju i podršci koju su mi pružali tijekom cijeloga školovanja.*

*Suprugu Hrvoju zahvaljujem na podršci.*

*Najviše od svega hvala kćerkici Miji, mojem nepresušnom izvoru ljubavi, sreće i energije.*

**Anja Mikolić**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. Kadmij u okolišu i izvori izloženosti ljudi	1
1.2. Kadmij u organizmu sisavaca	5
1.2.1. Unos kadmija u organizam	5
1.2.2. Apsorpcija u crijevima, prijenos i odstranjivanje kadmija iz organizma	6
1.2.3. Nakupljanje kadmija u ljudskom organizmu	11
1.2.4. Kadmij, posteljica i fetus	12
1.3. Štetni učinci kadmija u organizmu sisavaca uključujući ljude	14
1.3.1. Akutni učinci kadmija	15
1.3.2. Kronični učinci kadmija	16
1.3.3. Kadmij kao uzročnik kroničnih i malignih bolesti	20
1.4. Esencijalni elementi i njihova međudjelovanja s kadmijem	23
1.4.1. Željezo i kadmij	23
1.4.2. Cink i kadmij	29
1.4.3. Bakar, željezo i kadmij	35
1.5. Stvaranje spolnih hormona u steroidogenim organima i kadmij	40
1.5.1. Razvoj i struktura posteljice	40
1.5.2. Steroidogeneza u ljudi i štakora tijekom trudnoće odnosno skotnosti	42
1.5.3. Učinci kadmija na sintezu steroidnih hormona u posteljici i spolnim žlijezdama	44
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b>	<b>49</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	<b>51</b>
3.1. Pokusne životinje	51
3.2. Izloženost kadmiju	53
3.2.1. Obrazloženje odabira doze kadmija i puta izloženosti	53
3.2.2. Priprema otopine za izlaganje	54
3.3. Plan pokusa	55
3.3.1. Postupci tijekom istraživanja	57
3.4. Priprema tkiva za analize elemenata	64
3.4.1. Suho razaranje uzoraka	64
3.4.2. Mokro razaranje uzoraka	65
3.4.3. Visokotlačno mikrovalno razaranje uzoraka	66

3.5. Priprema uzoraka tkiva posteljice za analize steroidnih hormona.....	67
3.6. Analiza uzoraka.....	68
3.6.1. Određivanje koncentracija i količina kadmija.....	68
3.6.2. Određivanje količina željeza, cinka i bakra u organima i fetusu.....	70
3.6.3. Određivanje steroidnih hormona u serumu i posteljичnom tkivu.....	71
3.6.4. Određivanje hematokrita u štakorici i fetusu.....	72
3.7. Statistička obrada podataka.....	72
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>74</b>
4.1. Opći pokazatelji zdravlja štakorica.....	74
4.1.1. Tjelesne mase, mase svježih organa i mase fetusa.....	74
4.1.2. Prirast tjelesnih masa štakorica i prosječan unos krmiva i tekućine za napajanje	79
4.1.3. Broj žutih tijela u jajnicima te zametaka i fetusa u maternici.....	81
4.2. Kadmij i esencijalni mikroelementi u štakorici i fetusu.....	83
4.2.1. Količine kadmija u unutrašnjim organima štakorica, posteljici i fetusu.....	83
4.2.2. Količine željeza u unutrašnjim organima štakorica, posteljici i fetusu.....	85
4.2.2.1. Hematokrit u štakoricama i fetusima.....	85
4.2.3. Količine cinka u unutrašnjim organima štakorica, posteljici i fetusu.....	88
4.2.4. Količine bakra u unutrašnjim organima štakorica, posteljici i fetusu.....	88
4.3. Steroidni hormoni u serumu i posteljici štakorica.....	91
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>94</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>110</b>
<b>7. POPIS KRATICA.....</b>	<b>112</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>113</b>
<b>9. SAŽETAK.....</b>	<b>136</b>
<b>10. SUMMARY.....</b>	<b>138</b>
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....</b>	<b>140</b>
<b>BASIC DOCUMENTARY CARD.....</b>	<b>141</b>
<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>142</b>
<b>PRILOZI.....</b>	<b>145</b>



# 1. UVOD

## 1.1. Kadmij u okolišu i izvori izloženosti ljudi

Kadmij je dvovalentan prijelazni metal koji spada u skupinu 12 (II B) periodnog sustava elemenata. Otkrili su ga u Njemačkoj 1817. godine istodobno Friedrich Stromeyer i Karl Samuel Leberchet Hermann kao nečistoću u cinkovom karbonatu. Ime je dobio po latinskoj riječi *cadmia* za mineral kalamín iz kojega je kadmij prvi puta izoliran. Toksične učinke kadmija je prvi opisao Marmé 1867. godine istražujući otrovne učinke soli tog metala. Nakon toga je u prvoj polovici 20. stoljeća uslijedio veliki broj toksikoloških istraživanja štetnih učinaka kadmija na modelima pokusnih životinja (u: Nordberg, 2009).

U prirodi je kadmij prisutan u niskim količinama u rudama ponajprije s cinkom i, u manjoj mjeri, s olovom i bakrom. Zbog upotrebe u industriji i poljoprivredi, kadmij je prisutan svuda u ljudskom okolišu. Većina kadmija u okolišu (>90%) je posljedica ljudskih djelatnosti, što uključuje upotrebu mineralnih fosfatnih gnojiva, pepeo od izgaranja fosilnih goriva, ostatke nakon rudarenja cinkovih i olovnih ruda, ostatke nakon taljenja metalnih ruda, industrijski otpad, spaljeni komunalni otpad i kanalizacijski mulj. Zbog poželjnih fizikalnih i kemijskih svojstava poput otpornosti na hrđanje, pogotovo u kiselom ili slanom okolišu, niske temperature taljenja i visoke električne i toplinske provodljivosti, kadmij ima široku tehnološku i industrijsku primjenu. Upotrebljava se za zaštitu čelika i drugih legura od hrđanja, kao stabilizator proizvoda od polivinil klorida, u proizvodnji nikal-kadmijevih baterija, boja, eksploziva, u procesima galvanizacije i u metalurgiji te u tekstilnoj industriji, gdje se kao bojilo tekstilnih proizvoda pojavljuje kao nusproizvod (Järup, 2003; Martelli i sur., 2006; Pan i sur., 2010; WHO, 2010). Zbog znatnog porasta proizvodnje, upotrebe kadmija u industriji i otpuštanja kadmija u okoliš u 20. stoljeću, kadmij se često naziva i „metalom 20. stoljeća“. Kao onečišćivač koji je rasprostranjen u čitavom svijetu, kadmij je uvršten u listu otrovnih kemikalija u Međunarodnom registru mogućih otrovnih kemikalija Programa za okoliš Ujedinjenih naroda (*United Nations Environment Programme*, UNEP) (IRPTC, 1987). Danas je upotreba kadmija u većini država zakonski regulirana i istodobno se traže i načini njezinog smanjenja drugim, manje toksičnim metalima.

Kadmij iz prirodnih i antropogenih izvora dospijeva u zrak, vodu i tlo. Koncentracije kadmija u zraku su niske, a 10 do 15% ukupnog kadmija u atmosferi potječe iz prirodnih izvora, od čega je vulkanska aktivnost najvažniji prirodni izvor kadmija u zraku. Znatne količine kadmija koje se otpuštaju u atmosferu ljudskim aktivnostima se razlikuju između

pojedinih država. Taljenje metalnih ruda, odnosno otjecanje nastalog tekućeg otpada u slatke vode, mora i oceane predstavljaju najvažnije antropogene izvore kadmija u površinskim i podzemnim vodama. Veliki onečišćivači prirodnih voda su i rudnici metalnih ruda od kojih otpuštanjem vode za ispiranje ruda i otpadnih voda nakon njihove prerade, poplavama jezera s otpacima ruda te ispiranjem područja rudnika kišnicom dolazi do onečišćenja voda nizvodno od rudnika. Kadmij dopijeva u tlo taloženjem iz atmosfere, uporabom fosfatnih gnojiva i kanalizacijskog mulja za obogaćivanje na obradivim poljima te natapanjem zemlje ili poplavama onečišćenim vodama. Iz površinskih voda i onečišćenog tla kadmij dopijeva u prehrambeni lanac (WHO/EHC, 1992).

Izloženost ljudi kadmiju može biti iz okoliša (ambijentalna) i profesionalna. Najčešći izvori izloženosti općeg stanovništva kadmiju jesu prehrana (hrana i voda) i duhanski dim. U odnosu na unos hranom, unos kadmija vodom za piće je beznačajan i nastaje uporabom onečišćenog cinka za galvanizaciju cijevi ili spojeva u okovima koji sadrže kadmij, u grijačima za vodu, aparatima za hlađenje vode i u slavinama (Nordberg i sur., 2007; Pan, 2010; WHO, 2010). U nepušača je hrana glavni izvor unosa kadmija. Unos i nakupljanje kadmija u usjevima i povrću ovisi o svojstvima tla, uključujući koncentracije kadmija u tlu i pH vrijednosti tla, kao i o sastavu organske tvari u tlu i o vrsti biljke. Unos kadmija u biljke se povećava ako se pH vrijednost tla smanjuje. Nakupljanje kadmija ovisi o rodu i biološkoj vrsti biljke i nije jednoliko u svim dijelovima biljke. Lisnate biljke, kao što su zelena salata, špinat, celer i kupus nakupljaju kadmij u većoj mjeri, a gomoljasto i korjenasto povrće, kukuruz, mahunarke i grašak ga nakupljaju u manjoj mjeri. Ljudi su najčešće izloženi kadmiju u sljedećim namirnicama biljnog podrijetla: riža i pšenica (naročito u neoljuštenom zrnju), lisnato povrće, krumpir i jestive gljive. U namirnicama životinjskog podrijetla najviše količine kadmija su nađene u hrani morskog podrijetla (školjkama, rakovima i ribama) iz onečišćenih površinskih voda, mora i oceana te u jestivim iznutricama (bubrezima i jetri) stoke koja je pasla na poljima onečišćenim kadmijem kao i u pojedinim vrstama velike divljači (WHO/EHC, 1992; Järup i sur., 1998; Järup, 2003; JECFA, 2004; Nordberg i sur., 2007; Pan i sur., 2010; UNEP, 2010; WHO, 2010; EFSA, 2012).

Svakodnevni unos kadmija hranom ovisi o ukupnom unosu kalorija, prehrambenim navikama pojedinca, izvoru sirove hrane i obradi hrane prije konzumiranja. Prosječan unos kadmija hranom je u većini zemalja između 0,1 i 0,5  $\mu\text{g}$  Cd/kg tjelesne mase na dan. Ta vrijednost čini 40 do 60% tzv. privremeno prihvatljivog tjednog unosa (*provisional tolerable weekly intake*, PTWI). Za navedenu vrijednost PTWI se do nedavno smatralo da iznosi 7  $\mu\text{g}$  Cd/kg tjelesne mase na tjedan odnosno da je unos kadmija na dan (*provisional tolerable daily*

intake, PTDI) 1  $\mu\text{g/kg}$  tjelesne mase, kako je preporučila Združena skupina FAO/WHO stručnjaka za prehrambene aditive 1989. godine (JECFA, 2004; UNEP, 2010). Međutim, 2010. godine stručnjaci JECFA su dogovorno utvrdili da PTWI vrijednost treba smanjiti na 5,8  $\mu\text{g Cd/kg}$  tjelesne mase. Slijedom toga su stručnjaci Panela za onečišćivače u prehrambenom lancu Europskog tijela za sigurnost hrane (*European Food Safety Authority*, EFSA) ponovno procjenjivali te vrijednosti 2011. godine i kao prihvatljivu vrijednost tjednog unosa (TWI) odredili 2,5  $\mu\text{g Cd/kg}$  tjelesne mase kako bi se osigurala zaštita svih potrošača, uključujući najosjetljivije i izložene skupine stanovništva kao što su djeca, vegetarijanci i ljudi koji žive u onečišćenim područjima (EFSA, 2012). U radu Blanuša i Jureša (2001) su navedeni procijenjeni unosi kadmija hranom u općem stanovništvu u Hrvatskoj koji su iznosili 8,5 i 17,3  $\mu\text{g Cd}$  po osobi na dan, što je u to vrijeme iznosilo oko 20% tada prihvaćene vrijednosti PTWI od 7  $\mu\text{g Cd/kg}$  tjelesne mase.

Profesionalna izloženost kadmiju nastaje zbog izloženosti radnika u industrijama cinka, bakra i čelika, talionicama, prilikom električnog zavarivanja s uporabom kadmijevih elektroda te u proizvodnji nikal-kadmijevih baterija, sunčanih ćelija, nakita, metalnih oplata, uporabnih predmeta izrađenih od plastične mase i bojenju tekstilnih materijala (Nordberg i sur., 2007; UNEP, 2010). Udisanje čestica i dimnih plinova na radnom mjestu, čija koncentracija varira u različitim industrijama, je glavni način unosa kadmija pri toj vrsti izloženosti, a gutanje hrane i tekućine onečišćene prašinom koja sadrži kadmij predstavlja dodatan unos kadmija (WHO/EHC, 1992; Nordberg i sur., 2007; Nordberg, 2009). Na takvim radnim mjestima je u pušača nađen i do 10 puta veći unos kadmija zbog dodatne izloženosti kadmiju iz cigaretnog dima (Piscator, 1976).

Duhanski dim predstavlja najopasniji izvor izloženosti kadmiju budući da je njegova apsorpcija u dišnom sustavu viša nego u crijevima. U lišću biljke duhana se kadmij nakuplja do visokih razina. Jedna cigareta sadrži 1 do 2  $\mu\text{g Cd}$ , dok koncentracija kadmija u glavnoj struji cigaretnog dima može iznositi i do 6,7  $\mu\text{g Cd}$  po cigareti. Stoga pušenje cigareta može biti opasno i za tzv. pasivne pušače u blizini osobe koja puši. Pušenjem jedne cigarete udahne se oko 10 do 60% od ukupne količine kadmija sadržane u cigareti. U neonečišćenim područjima cigaretni dim predstavlja dodatan izvor unosa kadmija u aktivnih pušača i može biti jednak ili čak veći od unosa kadmija hranom. U pušača je unos kadmija 2 do 3 puta veći u odnosu na nepušače, pa se u njih izloženost duhanskom dimu može smatrati glavnim putem izloženosti kadmiju (Järup i sur., 1998; Piasek i sur., 2007; Pan, 2010; UNEP, 2010; WHO, 2010).

Kadmij je najzastupljeniji metalni ion u duhanskom dimu, koji ima dokazane perinatalne, neurotoksične i druge štetne toksične učinke, kao i kancerogena i genotoksična svojstva te mogućnost izazivanja endokrine disrupcije funkcija više žlijezda s unutrašnjim lučenjem (štitnjače, gušterače i spolnih žlijezda). Izloženost duhanskom dimu tijekom trudnoće može uzrokovati nisku porođajnu težinu što može imati dalekosežne štetne posljedice na razvoj djeteta i povećati rizik za ozbiljne zdravstvene poremećaje i kronične bolesti tijekom postnatalnog razdoblja, uključujući cerebralnu paralizu, mentalnu retardaciju, poremećaje ponašanja i poteškoće u učenju, ali i povećati opasnost za razvoj kroničnih bolesti u odrasloj dobi (Rogers, 2009). Zbog složenog sastava duhanskog dima s brojnim visokotoksičnim sastojcima, toksični i drugi štetni učinci duhanskog dima se, naravno, ne mogu pripisati isključivo izloženosti jednome od štetnih sastojaka, kao što je kadmij. S druge strane, postoje znanstveno utemeljeni dokazi da je kadmij svakako jedan od najotrovnijih sastojaka duhanskog dima u izazivanju štetnih oksidacijskih reakcija koje su temelj toksičnim i kancerogenim učincima duhanskog dima (Bachelet i sur., 2002).

Za procjenu izloženosti duhanskom dimu najčešće služe nikotin (u kosi) i kotinin, glavni metabolit nikotina (u krvi, slini, mokraći i majčinom mlijeku). Nikotin se nakuplja u kosi tijekom života, a s obzirom na to da kosa raste u prosjeku 1 cm na mjesec, svaki centimetar porasta kose odražava jednomjesečnu izloženost duhanskom dimu. Zbog ubrzanog metabolizma nikotina tijekom trudnoće, pogotovo u drugom i trećem tromjesečju, razine nikotina u kosi se smanjuju kako trudnoća napreduje. To smo pokazali u našem istraživanju u zdravih roditelja izloženih aktivnom i pasivnom pušenju cigareta (Brajenović i sur., 2013) zajedno s procjenama izloženosti i učinaka toksičnih metala, ponajprije kadmija. Našli smo i da, osim nikotina u kosi, koncentracija kadmija u posteljici također može poslužiti kao biološki biljeg izloženosti duhanskom dimu u aktivnih pušačica (Sekovanić i sur., 2013). Potonje dalje istražujemo zajedno s procjenama izloženosti i učinaka kadmija u osoba reproduktivne dobi i u pokusnih štakorica *in vivo*.

## 1.2. Kadmij u organizmu sisavaca

### 1.2.1. Unos kadmija u organizam

Moguća su tri puta unosa kadmija u organizam: na usta i apsorpcijom u želučanocrijevnom sustavu, udisanjem i apsorpcijom u dišnom sustavu i apsorpcijom kroz kožu.

Udjel apsorpcije kadmija u želučanocrijevnom sustavu nakon unosa hranom u ljudi iznosi od 1 do 10% što ovisi o razini izloženosti, vrsti kemijskog spoja, spolu, dobi, odnosno fiziološkom/patofiziološkom stanju i uhranjenosti organizma te o sastavu hrane kojom se unosi. U pojedinaca unos kadmija želučanocrijevnim putem može iznositi i do 20 do 30%. Na povećanu apsorpciju kadmija u crijevu mogu utjecati smanjenja unosa željeza, cinka, bakra, selen, kalcija i/ili vitamina D i drugih nutrijenata. Jedan od najvažnijih učinaka na apsorpciju kadmija u želučanocrijevnom sustavu je stanje željeza u organizmu. Pokazano je da je apsorpcija kadmija u ljudi s niskim zalihama željeza oko 5% veća u odnosu na ljude s dovoljnom količinom željeza u organizmu. Zbog toga u ljudi s pomanjkanjem željeza, u rasponu od blage deficijencije do anemije, kao što su djeca i žene u reproduktivnom razdoblju, uključujući razdoblja trudnoće i dojenja, može biti višestruko povećana apsorpcija kadmija. U tim skupinama stanovništva je pokazano povećano nagomilavanje kao i povećana opasnost za toksične učinke kadmija (Kostial, 1986; WHO/EHC, 1992; Järup i sur., 1998; JECFA, 2004; Satarug i Moore, 2004; Godt i sur., 2006; Nordberg i sur., 2007; UNEP, 2010). Obrnuto, dostatan unos željeza može smanjiti crijevnu apsorpciju kadmija u štakora i do 80% (Groten i sur., 1992). Istraživanja na pokusnim životinjama su pokazala da prehrana bogata vlaknima, fitatima i/ili ligninom također smanjuje crijevnu apsorpciju kadmija.

Apsorpcija kadmija u želučanocrijevnom sustavu pokusnih životinja je općenito manja i u štakora iznosi 0,3 do 3% (ATSDR, 2012). U pokusnih miševa je dokazano da se crijevna apsorpcija kadmija tijekom skotnosti i laktacije povećava dva do tri puta (Bhattacharyya, 1991).

Apsorpcija kadmija u dišnom sustavu ovisi o veličini i topljivosti udahnutih čestica kadmija i može varirati od 10 do 50% i više, jer traje još neko vrijeme nakon udisanja. Ta apsorpcija ovisi o veličini čestica, veća je prilikom udisanja manjih nego većih čestica i ovisi o obliku spoja u kojem je kadmij udahnut. Izlaganje radnika dimnim plinovima i česticama u industriji (pr. prilikom zavarivanja) može dovesti do razvoja sindroma akutnog poremećaja dišnog sustava (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS), koji u najtežem obliku može imati i smrtni ishod. U ljudskim plućima se najčešće apsorbira 40 do 60% kadmija iz

cigaretnog dima. U krvi pušača su nađene 4 do 5 puta veće koncentracije kadmija u odnosu na nepušače (WHO/EHC, 1992; Järup i sur., 1998; Satarug i Moore, 2004; Godt i sur., 2006; Nordberg i sur., 2007; UNEP, 2010).

Apsorpcija kadmija kroz kožu je zanemariva i jako niska. Iznosi oko 0,5% u pokusnih životinja. Omogućuju ju dva mehanizma: vezanje slobodnih iona kadmija za sulfhidrilne skupine aminokiseline cistein u keratinu površinskog sloja kože i stvaranje kompleksa kadmija s proteinskim ligandom metalotioneinom (Cd-MT) (WHO/EHC, 1992; Godt i sur., 2006; Nordberg i sur., 2007).

### **1.2.2. Apsorpcija u crijevima, prijenos i odstranjivanje kadmija iz organizma**

Želučanocrijevna apsorpcija kadmija se odvija u crijevnim stanicama ili enterocitima, većinom u dvanaesniku, a dijelom i u jejunumu. Označava je brzi unos i nakupljanje kadmija u sluznici crijeva te spori prijenos kadmija iz stanica sluznice u krvni optok čak i pri niskim dozama kadmija (Elsenhans i sur., 1997). Kemijski oblik kadmija također utječe na crijevni unos čime neizravno i na prijenos metala u tijelu. Poznato je da je nakupljanje i zadržavanje kadmija u crijevima veće nakon peroralne izloženosti kadmiju u obliku soli kao što je  $\text{CdCl}_2$  nego u kompleksu Cd-MT, kakav je najčešći u hrani, jer se taj kompleks slabije apsorbira u crijevima (Groten i sur., 1991; Sugawara i Sugawara, 1991; ATSDR, 2012). Nakon peroralnog unosa Cd-MT vs.  $\text{CdCl}_2$  omjer količine u jetri je manji nego u bubregu (Groten i sur., 1991), Cd-MT se brže izlučuje mokraćom i bubrežna su oštećenja češća i ozbiljnija (Min i sur., 1986).

Niz desetljeća se pokušavaju naći odgovori na koji način se kadmijevi ioni apsorbiraju iz unutrašnjosti crijeva u enterocite. Pri tome su prepoznata ova dva koraka: prvo nastaje brzo vezanje kadmijevih iona za luminalni dio stanice u procesu koji je dostupan kelatorima, nije osjetljiv na temperaturu, reverzibilan je, nekompetitivan i nespecifičan te može biti inhibiran kationima drugih metala; potom slijedi polagano pomicanje kadmija s luminalnog dijela membrane u stanice enterocita, u procesu koji je osjetljiv na temperaturne promjene i nije dostupan kelatorima (Foulkes 1985; 1988; 1989; 2000; Foulkes i McMullen, 1987; Foulkes i Bergman, 1993). Međutim, prijenos kadmija u enterocite i mehanizmi koji to omogućavaju nisu ni do danas do kraja razjašnjeni. Smatra se da kadmij može proći luminalnu membranu enterocita ionskom mimikrijom pomoću ionskih prijenosnika ili molekularnom mimikrijom ako je vezan za aminokiseline ili peptide. U staničnoj membrani enterocita kadmij je prisutan u obliku kompleksa, vezan za jednu ili više sulfhidrilnih skupina u molekuli cisteina ili

glutaciona. Mehanizam prijenosa kadmijevih kompleksa s aminokiselinama u crijevima nije do kraja rasvijetljen, ali se pretpostavlja ga omogućavaju prijenosnici za aminokiseline odnosno peptide. Dokazano je da dvovalentni prijenosnik metala (DMT1) u luminalnoj membrani enterocita ima glavnu ulogu u prijenosu ne-hem željeza, ali sudjeluje i u prijenosu drugih dvovalentnih kationa uključujući kadmij. Osim u enterocitima, ekspresija prijenosnika DMT1 je nađena i u jetrenim stanicama (hepatocitima), epitelnim stanicama bubrežnih kanalića, plućima, srcu, mozgu i u testisima (Gunshin i sur., 1997; Park i sur., 2002; Zalups i Ahmad, 2003; Ryu i sur., 2004; Bridges i Zalups, 2005; Kim i sur., 2007; Thévenod, 2010).

Danas je poznato da bazolateralni proteinski prijenosnik metala (MTP1), poznat i pod nazivom ferroportin (FPN1), posreduje prilikom prijenosa željeza kroz bazolateralnu membranu enterocita u jetreni krvotok. Ekspresija prijenosnika MTP1, slično kao i ekspresija DMT1, ovisi o stanju željeza u organizmu, pa se zbog sličnosti i zajedničkog mehanizma unosa u enterocite kroz luminalnu membranu, pretpostavlja da ioni željeza i kadmija mogu prijeći i bazolateralnu membranu pomoću zajedničkog prijenosnika. Iako za to još uvijek nema dokaza, pretpostavlja se da prijenosnik MTP1 sudjeluje i u prijenosu kadmija iz enterocita u jetreni (portalni) krvotok (Ryu i sur., 2004; Bridges i Zalups, 2005; Martelli i sur., 2006; Kim i sur., 2007). Istraživanja na odraslim pokusnim štakorima i miševima su dokazala da je apsorpcija kadmija u crijevima povezana s ekspresijom prijenosnika odgovornih za prijenos ne-hem željeza: za influks u luminalnom dijelu prijenosnikom DMT1 i za efluks u bazolateralnom dijelu prijenosnikom MTP1 (Park i sur., 2002; Bressler i sur., 2004; Ryu i sur., 2004; Martelli i sur., 2006; Kim i sur., 2007). Najnovija istraživanja upućuju da želučanocrijevna apsorpcija kadmija može biti posredovana i proteinskim prijenosnicima iz skupine ATP veznih kazeta (ABC) (u: Thévenod, 2010).

Povećane potrebe za željezom tijekom trudnoće, zbog potrebe za prijenosom željeza do fetusa, dovode do povećane ekspresije prijenosnika DMT1 i veće crijeвне apsorpcije kadmija što bi moglo dovesti i do većeg prijenosa kadmija kroz posteljicu do fetusa (Leazer i sur., 2002). Povećana ekspresija prijenosnika DMT1 i povećan unos kadmija prehranom su česti u žena s nedovoljnom količinom željeza u organizmu, što je čest nalaz tijekom reproduktivne dobi (Choudhury i sur., 2001). Nedavno istraživanje na modelu novorođenačkih crijevnih stanica je pokazalo da prijenosnici DMT1 i MTP1 najvjerojatnije ne sudjeluju u prijenosu kadmija kroz stanice crijeva novorođenčadi, već da tu ulogu u najranijoj životnoj dobi ima jedan drugi prijenosnik, tzv. protein povezan s višestrukom otpornošću na lijekove (MRP1) (Öhrvik i sur., 2013).

Pretpostavlja se da je prijenos iona kadmija u stanice enterocita moguć i mehanizmom unosa za cink. Naime, Elisma i Jumarie (2001) su pokazali da se kadmij i cink također natječu za isti prijenosnik na luminalnoj membrani enterocita, a koji nije DMT1. Pretpostavlja se da se radi o ljudskom prijenosniku cinka kojeg regulira cink (hZTL1), a koji je ponajprije odgovoran za unos cinka u stanice i nalazi se u luminalnoj membrani enterocita (Cragg i sur., 2001). Ioni kadmija mogu prijeći bazolateralnu membranu i pomoću prijenosnika cinka ZnT1. S obzirom na to da je dokazana prisutnost tog prijenosnika u bazolateralnoj membrani enterocita kao i uloga u prijenosu cinka, pretpostavlja se da bi mogao sudjelovati i u prijenosu kadmija kroz bazolateralnu membranu enterocita (Bridges i Zalups, 2005).

Iako postoji malo podataka i dokaza o prolazu kadmijevih iona kroz kalcijske kanale u membrani stanica crijeva, pretpostavlja se mogućnost o natjecanju kadmijevih i kalcijevih iona na luminalnoj strani stanične membrane enterocita. Istraživanja *in vitro* na različitim staničnim linijama su pokazala da se kadmij i kalcij natječu za ista mjesta vezanja na membranskoj strani kalcijevih kanala te da kadmijevi ioni mogu imitirati kalcijeve ione (Hinkle i sur., 1987; Blazka i Shaikh, 1991; Friedman i Gesek, 1994; Souza i sur., 1997). Istraživanja *in vivo* provedena na pokusnim štakorima su pokazala da je u uvjetima kroničnog pomanjkanja kalcija u prehrani crijevna apsorpcija kadmijevih iona bila povećana što upućuje na zaključak da je u tim uvjetima bio povećan unos kadmija pomoću kalcijevih kanala u enterocite (Felley-Bosco i Diezi, 1992). Kadmijevi ioni također mogu inhibirati vezanje kalcijevih iona na crijevnoj strani Ca-ATPaze, u bazolateralnoj plazmatskoj membrani enterocita, koristeći se tim prijenosnikom za prijenos od enterocita u jetreni i tjelesni krvotok (Verboost i sur., 1987; Schönmakers i sur., 1992).

Nakon peroralnog unosa hranom ili vodom u organizam, kadmij se prvo nalazi u slobodnom ionskom obliku i potom se veže za proteinske ligande. Može se vezati za male molekule poput glutationa (u dvanaesniku) odnosno na proteine poput albumina (u plazmi) te konačno na specifični proteinski ligand metalotionein (MT). Metalotioneini su proteini niske molekulske mase (6-7 kDa) s visokim sadržajem aminokiseline cisteina (30%). Zbog velikog broja sulfhidrilnih skupina u molekuli cisteina, MT može vezati esencijalne elemente cink i bakar, ali i toksične metale kadmij i živu kao i polumetal arsen. Svaka molekula MT može vezati do sedam atoma kadmija. Metalotioneini su prisutni u mnogim organima, a najviše ih ima u jetri, bubregu, gušterači i crijevima. Od četiri nađena oblika MT, metalotionein-1 (MT-1) i metalotionein-2 (MT-2) su najpoznatiji i u velikoj mjeri zastupljeni u većini tkiva, metalotionein-3 (MT-3) je pretežno prisutan u mozgu, a metalotionein-4 (MT-4) u rožnatim epitelnim stanicama kože te u početnom dijelu želučanocrijevnog sustava. Najvažnije uloge



svih oblika MT u normalnim fiziološkim okolnostima jesu u metabolizmu i homeostazi esencijalnih elemenata cinka i bakra te u uklanjanju slobodnih radikala koji izazivaju oksidacijski stres. Sinteza MT koju potiče cink ili kadmij u jetri može utjecati na vezanje i međustaničnu razdiobu svakog od tih elemenata pri čemu se može smanjiti i akutna toksičnost kadmija (Bhattacharyya i sur., 2000; Waalkes i Pérez-Olle, 2000; Coyle i sur., 2002; Cai i sur., 2010). Međudjelovanja MT, cinka, bakra i kadmija su opisana detaljnije dalje u tekstu.

Uloga MT u apsorpciji kadmija kroz luminalni dio membrane enterocita nije poznata. Iako postoje rezultati da nakon peroralnog unosa kadmija razine MT u crijevima nisu utjecale na njegovu apsorpciju u crijevima, kao ni na daljnju razdiobu u jetru i bubregu (Liu i Klassen, 1996; Liu i sur., 2001a; 2001b), drugi rezultati pokazuju da nakon peroralnog unosa određena količina Cd-MT ulazi u jetreni krvotok i da se prenosi u bubreg (Cherian, 1979; Sugawara i Sugawara, 1991; Kimura i sur., 1998). Dva pretpostavljena načina kojima bi Cd-MT mogao prolaziti kroz enterocit u krvotok jesu: 1) unosom kompleksa Cd-MT u enterocit endocitozom uz daljnji prijenos kroz bazolateralnu membranu egzocitozom odnosno otpuštanjem Cd-MT u krvotok nakon oštećenja i smrti enterocita uzrokovanih Cd-MT (Zalups i Ahmad, 2003; Sabolić i sur., 2010); 2) prolaskom između stanica enterocita budući da može raskinuti međustanične sveze, kako je pokazano u istraživanjima provedenim na mišjim hepatocitima, štakorskim epitelnim stanicama i u raznim staničnim kulturama (Jeong i sur., 2000; Prozialeck, 2000; 2003).

Kadmij nakon apsorpcije kroz sluznicu dvanaesnika ili u plućima ulazi u krvni optok gdje je prvo vezan na albumin, ali može biti vezan i za cistein, homocistein i/ili glutation, koji su u krvi prisutni u niskim koncentracijama. U krvi se kadmij nalazi uglavnom vezan na eritrocite. Koncentracija kadmija u punoj krvi odražava nedavnu izloženost metalu. Kadmij se krvlju prenosi u jetru gdje se oslobađa i može potaknuti sintezu MT pa se nakon toga dalje prenositi krvlju pomoću MT i transferina do drugih unutrašnjih organa. Nakon kratkotrajne (akutne) izloženosti najveći dio kadmija (50 do 60%) se zadržava u jetri gdje može imati toksične učinke. Dugotrajna (kronična) izloženost kadmiju potiče sintezu MT u stanicama jetre pri čemu je jetreni parenhim do određene mjere zaštićen od toksičnih učinaka kadmija. Dio nakupljenog kadmija u jetri izlučuje se u žuč u obliku kadmij-glutation konjugata i dopijeva natrag u crijeva tzv. enterohepatičkim ciklusom. Potrebno je naglasiti da se najveći udjel peroralno unesenog kadmija odstranjuje iz tijela stolicom (Bhattacharyya i sur., 2000). Međutim, ako je došlo do apoptoze i/ili nekroze jetrenih stanica izazvane nakupljenim kadmijem, dio kadmija vezanog za MT se otpušta iz jetre u krv, filtrira u bubrežnim kanalčićima gdje se reapsorbira i zadržava u bubrežnom tkivu.

Reapsorpcija kompleksa Cd-MT u bubrežnim kanalićima se odvija procesom apsorpcijske endocitoze pomoću prijenosnika ZIP8 (Wang i sur., 2007). Prilikom dugotrajne izloženosti slobodni kadmij u bubrežnim kanalićima također potiče sintezu MT, koji zatim veže kadmij i štiti stanice od toksičnih učinaka kadmija sve dok količina slobodnog kadmija ne naraste iznad razine koja se može vezati za MT. U takvim slučajevima može doći do propadanja pokrovnih epitelnih stanica bubrežnih kanalića i njihove nekroze. Veći dio kadmija izlučuje se iz bubrega sustavom kanalića i u mokraći se nalazi uglavnom u obliku kompleksa Cd-MT. Koncentracija kadmija u mokraći odražava prethodnu izloženost i proporcionalna je količini kadmija nakupljenog u organizmu, najviše u bubrežima. U mokraći pušača u odnosu na nepušače su nađene dvostruko više koncentracije kadmija zbog specifičnih uvjeta povećanog unosa i zadržavanja kadmija u organizmu duhanskim dimom. U žena starije dobi se u pravilu nalaze više koncentracije kadmija u mokraći nego u muškaraca jednake dobi što je povezano s povećanim nakupljanjem kadmija u žena tijekom reproduktivne dobi kad je povećan unos esencijalnih i toksičnih elemenata, što je detaljnije opisano dalje u tekstu (WHO/EHC, 1992; Järup i sur., 1998; Bhattacharyya i sur., 2000; Zalups i Ahmad, 2003; Godt i sur., 2006; Nordberg i sur., 2007; 2009; UNEP, 2010).

### **1.2.3. Nakupljanje kadmija u ljudskom organizmu**

Kadmij je kumulativan metal s dugačkim vremenom biološkog poluživota koje iznosi od 10 do 30 godina. Tijekom prve tri godine života razine kadmija u ljudima se povećaju do 200 puta. Regionalne razlike znatno utječu na razine kadmija u ljudskom organizmu. Zbog neizbježne sveprisutnosti kadmija u ljudskom okolišu, ukupna količina kadmija u neizložene osobe srednjih godina iznosi 5 do 20 mg. Kadmij se nakuplja tijekom života u unutrašnjim organima, najviše u jetri (15%) i u bubrezima (50% od ukupne količine kadmija u organizmu).

Bubreg je jedan od glavnih ciljnih organa za toksične učinke kadmija pri dugotrajnoj izloženosti niskim dozama kadmija. Razine kadmija u bubrezima su 10 do 15 puta veće od onih u jetri i u pedesetogodišnjaka iznose oko 12 µg/g u nepušača i 25 µg/g u pušača koji puše kutiju cigareta ili više na dan. Kadmij se u bubrezima nakuplja do otprilike 50. i 60. godine života nakon čega ostaje jednak ili opada. U žena su nađene više razine kadmija u bubrezima u odnosu na muškarce jednake dobi zbog povećanog nakupljanja kadmija tijekom reproduktivne dobi kada postoji sklonost deficijencijama esencijalnih elemenata. Ostali organi u kojima se kadmij nakuplja su pluća, gušterača, slezena i žlijezde s unutarnjim lučenjem (Kostial, 1986; WHO/EHC, 1992; Bhattacharyya i sur., 2000; Nordberg i sur., 2007).

Kadmij se tijekom života također nakuplja u reproduktivnim organima hipotalamsko-hipofizno-gonadalne funkcionalne osi u oba spola, a tijekom trudnoće i u posteljici (Chedrese i sur., 2006; Takiguchi i Yoshihara, 2006; Piasek i sur., 2007; Thompson i Bannigan, 2008).

#### 1.2.4. Kadmij, posteljica i fetus

Posteljica (lat. *placenta*: kolač, od grč. *plakos*: ravan kolač, ili *plak*: ploča) je privremeni organ jedinstvene građe s brojnim funkcijama koje su nužne za preživljavanje, rast i razvoj ploda. Tijekom trudnoće dolazi do složenih međudjelovanja unutar maternalno-placentalno-fetalne funkcionalne jedinice pri čemu fiziološki događaji vezani za rast i razvoj fetusa utječu na fiziološke promjene u majčinom organizmu. Posteljica se nalazi na sučelju i ujedno predstavlja poveznicu između krvotoka majke i krvotoka fetusa.

Najvažnije funkcije posteljice jesu: maternalno-fetalni prijenos esencijalnih nutrijenata, vitamina i esencijalnih elemenata, odstranjivanje metabolita iz fetusa, razmjena plinova s unosom kisika u fetus i izbacivanjem ugljičnog dioksida iz fetusa. U posteljici se također odvija sinteza nekoliko vrsta hormona, polipeptidnih i steroidnih, o čemu će biti riječi dalje u radu. Sve te posteljične funkcije su nužne za održavanje trudnoće do rađanja zdravog i zrelog djeteta, sposobnog za život izvan maternice.

U trenutku rođenja, kadmij praktički nije prisutan u organizmu (Kostial, 1986). Tome je razlog njegovo zadržavanje u majčinom organizmu, nakupljanje u posteljici i minimalan prijenos u fetus. Razvojem metoda koje su omogućile mjerenje kadmija u organima fetusa i novorođenčadi je pokazano da posteljica ipak nije potpuna prepreka za prolaz kadmija do fetusa, kako se do tada smatralo (Chaube i sur., 1973; Cumbrowski i Auermann, 1980). Stoga je kadmij posebno opasan za plod u ranoj trudnoći kad još nije razvijena posteljica i ne postoji kao djelomična prepreka za prolaz kadmija iz majčinog organizma do ploda (Dencker i sur., 1983; Clarkson i sur., 1985). U nedavnom radu Piasek i suradnika (2014) je prikazano da su razine kadmija u posteljicama štakorica peroralno izloženih kadmiju čak do 20 puta veće od vrijednosti izmjerenih u krvi štakorice.

Zbog nakupljanja kadmija u posteljici ne dolazi do izravnih učinaka kadmija na fetus *in utero* kao što je to slučaj s drugim toksičnim metalima koji se lako prenose kroz posteljicu (olovo i metil živa). Međutim, neizravni učinci kadmija nakupljenog u posteljici mogu imati veoma nepovoljne učinke remećenjem posteljične funkcije u prijenosu esencijalnih nutrijenata od majke do fetusa i sintezi posteljičnih hormona, uključujući steroidne hormone. To sve može dovesti do niza nepovoljnih neposrednih i dugotrajnih posljedica, kako na preživljavanje fetusa *in utero* i perinatalni rast i razvoj, tako i na smanjene fetalne količine željeza i anemiju nakon rođenja te fetalne i novorođenačke deficijencije cinka, bakra i drugih esencijalnih nutrijenata nužnih za rast i razvoj ploda (Beck, 1981; Levin i sur., 1983;

Pasqualini i Kincl, 1985; Piasek i sur., 2007; Henson i Chedrese, 2004; Carter i sur., 2012; Caserta i sur., 2013).

Istraživanja starijeg datuma su pokazala kako nakupljanje kadmija u ljudskoj posteljici može uzrokovati promjene u njezinoj tkivnoj strukturi (Copius Peereboom-Stegeman i sur., 1983; van der Velde i sur., 1983; Guiet-Bara i sur., 1991). Šezdesetih godina prošloga stoljeća su nađene karakteristične promjene u vaskularizaciji posteljičnog tkiva štakorice u uvjetima izloženosti visokim dozama kadmija (Pařizek, 1964; 1983). Također su nađene morfološke promjene u posteljici s mogućnošću uginuća fetusa u ovisnosti o uvjetima izloženosti kadmiju (Levin i Miller, 1981; Levin i sur., 1983; 1987). Nalazi dobiveni elektronskom mikroskopijom su pokazali oštećenja u posteljičnom tkivu pokusnih životinja već šest sati nakon izlaganja kadmiju (di Sant' Agnese i sur., 1983).

Istraživanja provedena posljednjih desetljeća diljem svijeta uporabom bioloških biljega izloženosti toksičnim metalima u ljudskim posteljicama su pokazala povećane vrijednosti kadmija u posteljicama žena izloženih, u najvećoj mjeri, duhanskom dimu, u kojih su vrijednosti količina kadmija 10 do 100 puta veće od vrijednosti koncentracija kadmija u majčinoj krvi (Esteban-Vasallo i sur., 2012). Najviše se kadmija nakuplja u posteljici pri kraju trudnoće, što se može objasniti povećavanjem površine za razmjenu tvari između majčinog i fetalnog krvotoka kao i povećanim volumenom krvi u tijelu majke (Hendrickx i Houston, 1970; Magos i Webb, 1983; Pasqualini i Kincl, 1985). Istodobno su razine kadmija u krvi pupkovine, kao pokazatelja količine kadmija u fetusu, i do nekoliko stotina puta manje od vrijednosti kadmija u posteljici (Piasek i sur., 2014).

Mehanizmi nakupljanja i zadržavanja kadmija u posteljici nisu u potpunosti razjašnjeni i ne postoji puno više saznanja o tome negoli ih je bilo prije više od dva desetljeća, kada je postavljeno nekoliko ključnih pitanja o tome kako to da se kadmij zadržava u posteljici, a istodobno se odvija olakšan transplacentarni prijenos esencijalnih elemenata cinka i bakra kao i drugih nutrijenata od majke do fetusa (Goyer, 1995). Nađeno je da se u štakorica izloženih kadmiju (parenteralno) do početka skotnosti povišuje koncentracije kadmija i MT u plazmi tijekom skotnosti i da se to zbiva zbog mobilizacije kadmija nakupljenog u jetri, pa je tako povećana mogućnost nakupljanja kadmija u bubregu i posteljici (Chan i Cherian, 1993; Chan i sur., 1993). Smatralo se da je to moguće objasniti vezanjem kadmija za MT čiju sintezu kadmij potiče u posteljičnom sinciciotrofoblastu (Goyer, 1995). Tako su Kippler i suradnici (2010) pokazali da je ekspresija MT bila znatno povišena u trudnica kojima su izmjerene visoke koncentracije kadmija u posteljici, što je navelo na zaključak da bi MT mogao biti odgovoran za zadržavanje kadmija u posteljici. S druge strane,

izmjerene vrijednosti kadmija u fetusu pokazuju da dio kadmija ipak prolazi kroz posteljicu do fetusa, što bi značilo da MT ne sprječava sasvim prolaz kadmija kroz posteljicu. Nedavno istraživanje koje su proveli Nakamura i suradnici (2012) na štakoricama peroralno izloženima kadmiju prije i za vrijeme skotnosti i još četiri tjedna tijekom dojenja je pokazalo da MT sudjeluje u zadržavanju kadmija u posteljici, ali da ne sudjeluje u prijenosu kadmija od majke do fetusa. Slično je pokazano u istraživanjima na miševima izloženima kadmiju u tekućini za piće tijekom skotnosti i dojenja gdje MT nije imao ključnu ulogu u sprječavanju prijenosa kadmija od majke do fetusa kroz posteljicu (Brako i sur., 2003). Najnovija istraživanja pokazuju da bi u prenošenju kadmija kroz posteljicu mogli sudjelovati prijenosnici iz obitelji ZIP proteina, ZIP8 i ZIP14. Na te zaključke navode nalazi visoke ekspresije obaju prijenosnika u ljudskoj posteljici (Jenkitkasemwong i sur., 2012) kao i otkrića da ZIP8 i ZIP14 proteini imaju visoki afinitet za vezanje kadmija i važnu ulogu u unosu kadmija u stanice (Fujishiro i sur., 2009; Girijashanker i sur., 2008).

### **1.3. Štetni učinci kadmija u organizmu sisavaca uključujući ljude**

Kadmij je toksičan metal za koji nisu dokazani povoljni fiziološki učinci u organima sisavaca, uključujući ljude. Uzevši u obzir nedavno postavljen koncept tzv. ekspozoma, koji obuhvaća sveukupnu izloženost iz okoliša od začeca do smrti (Rappaport, 2012; Wild, 2012) te činjenicu da je kadmij sveprisutan metal u ljudskom okolišu i može biti povezan s brojnim kroničnim bolestima i zdravstvenim poremećajima, koji su nastali dijelom i zbog perinatalne izloženosti preko majke, istraživanja kadmija pri tome imaju posebnu važnost. Štetni učinci kadmija u organizmu ovise o uvjetima izloženosti, dakle unesenoj količini (dozi) kadmija, trajanju izloženosti i putovima izloženosti te specifičnim značajkama svake osobe koja je izložena. Kadmij je kumulativan otrov i njegovi su toksični učinci povezani s dugotrajnom (kroničnom) izloženošću. To je slabije istraženo od očitih, akutnih otrovanja, pa su mogući toksični učinci zbog duge izloženosti niskim dozama opasniji i nisu uvijek prepoznati (Kostial, 1986; WHO/EHC, 1992; Nordberg i sur., 2002; 2007).

### 1.3.1. Akutni učinci kadmija

U ljudima se akutni učinci otrovanja kadmijem javljaju u plućima nakon udisanja čestica i dimnih plinova koji sadrže kadmij i u želučanocrijevnom sustavu nakon unošenja kadmija *per os*. U današnje se vrijeme javljaju kao slučajna (akcidentalna) otrovanja ili, kako je već naprijed spomenuto, u uvjetima profesionalne izloženosti i imaju posebne značajke (Blanuša i sur., 2005; Varnai i sur., 2009).

Akutna otrovanja su se često javljala u prošlosti kao posljedica udisanja dimova i čestica kadmija nakon otapanja ili razgradnje spojeva koji sadrže kadmij ili pri poslovima lemljenja sa srebrom i kadmijem. Prvi slučaj otrovanja udisanjem čestica s kadmijem opisao je Sovet 1858. godine nakon poliranja srebra prahom kalcijevog karbonata (Sovet, 1858). U današnje vrijeme do akutnog otrovanja kadmijem dolazi uglavnom nakon izloženosti kadmijevim dimnim plinovima ili prašini. Različita topljivost različitih kemijskih oblika kadmija u vodi može utjecati na razinu toksičnosti kadmija pri udisanju (Oberdorster i sur., 1985). Procijenjena smrtna doza kod osmosatne izloženosti kadmijevom oksidu je  $5 \text{ mg/m}^3$ , iako su već pri izloženosti dozi od  $1 \text{ mg/m}^3$  u jednakom razdoblju primijećeni znakovi otrovanja u osjetljivih ljudi (Friberg i sur., 1974). Znakovi otrovanja koji se javljaju 24 sata nakon udisanja čestica kadmija jesu: suha i nadražena sluznica nosa, usta i ždrijela, kihanje, glavobolja, vrtoglavica, temperatura, groznica, bol u prsima, povraćanje i proljev. U težim slučajevima otrovanja može doći do razvoja plućnog edema i akutnog kemijskog pneumonitisa, što može imati smrtni ishod. Zbog oštećenja sluznice može doći do intraalveolarnog krvarenja i iskašljavanja krvi. Nakon otrovanja udisanjem kadmija uglavnom dolazi do potpunog oporavka, no u slučajevima plućnog edema ili akutne nekroze bubrežnih kanalića može doći i do smrti (Carmichael i sur., 1982; WHO/EHC, 1992; Godt i sur., 2006; Nordberg i sur., 2007).

Znakovi akutnog otrovanja kadmijem u želučanocrijevnom sustavu u ljudi nastaju zbog konzumiranja hrane ili pića iz ambalaže koja je obložena kadmijem, preko hrane koja je kuhana u posuđu koje sadrži kadmij ili nakon što kadmij dospije u vodu iz armatura ili hladnjaka u uređajima za vodu. Nakon što koncentracija kadmija u vodi prijeđe  $15 \text{ mg/l}$  javljaju se prvi znakovi otrovanja u obliku povraćanja. Ostali znakovi akutnog otrovanja kadmijem su mučnina, glavobolja, pojačano izlučivanje sline, bolovi i grčevi u trbuhu i proljev. S obzirom na to da spajanjem kadmija iz organskih soli sa solnom kiselinom u želucu nastaje kadmijev klorid koji izaziva povraćanje i da je apsorpcija kadmija u želučanocrijevnom sustavu relativno mala, nakon otrovanja relativno brzo dolazi do

oporavka. U slučajevima teškog otrovanja može doći do šoka zbog gubitka tekućine i smrti unutar 24 sata ili akutnog zatajenja bubrega sa zakazivanjem funkcija srca i pluća. Potonje može dovesti do smrti unutar jednog ili dva tjedna nakon otrovanja. U slučajevima preživljavanja mogu zaostati trajna oštećenja jetre i bubrega (Carmichael i sur., 1982; WHO/EHC, 1992; Nordberg i sur., 2007).

### **1.3.2. Kronični učinci kadmija**

U današnje vrijeme kronični učinci i/ili otrovanja kadmijem nastaju zbog neodgovarajuće zaštite radnika u industrijama u kojima su izloženi kadmiju te u slučajevima dugotrajnog peroralnog unosa kadmija iz okoliša. Simptomi kroničnog otrovanja kadmijem se očituju, između ostalog, poremećajima dišnog sustava ili funkcije i strukture bubrega te prijelomima kostiju (Blanuša i sur., 2005; Nordberg i sur., 2007; Varnai i sur., 2009).

#### ***Učinci kadmija u plućima***

Učinci kadmija u dišnom sustavu su mogući u profesionalno izloženih radnika. Težina ozljeda ovisi o duljini, dozi i putu izloženosti. U gornjim dišnim putovima dolazi do kroničnih upala sluznice nosa, ždrijela i grla te može doći i do poremećaja osjeta njuha. U donjim dišnim putevima može nastati kronična opstruktivna plućna bolest različitog intenziteta. Od kada je Friberg (1950) uočio poremećaje funkcija pluća u profesionalno izloženih osoba, mnoga istraživanja su potvrdila njegova opažanja i omogućila spoznaje uvjeta i srazmjera štetnosti izloženosti kadmiju u ljudima. Lauwerys i suradnici (1974) su nakon razdvajanja pušača od nepušača uočili mala pogoršanja u plućnim funkcijama, koja su se javila tek 20 godina nakon izloženosti radnika kadmiju, dok su u pušača takva pogoršanja općenito jače izražena, s mogućim aditivnim ili sinergističkim štetnim učincima. Prognoze za ozdravljenje nakon oštećenja dišnog sustava su loše s obzirom na to da se bolest nastavlja i nakon prestanka izloženosti na radnom mjestu. Moguća su pogoršanja u obliku zatajenja pluća što može dovesti do razvoja bubrežne bolesti, a u radnika izloženima visokim razinama kadmija uočena je povećana smrtnost (Carmichael i sur., 1982; WHO/EHC, 1992; Nordberg i sur., 2007).



### ***Učinci kadmija na bubrege***

Štetni učinci kadmija na bubrege su najvažnija moguća štetna posljedica u osoba kronično izloženih kadmiju. Kako je prije opisano, kadmij dolazi do bubrega krvlju izravno i/ili iz jetre u obliku kompleksa Cd-MT. Unutar stanice Cd-MT djeluje zaštitno, dok je izvanstanični Cd-MT nefrotoksičan, kako je pokazano u parenteralnim uvjetima unosa Cd-MT (Goyer, 1989). Reapsorpcijom Cd-MT dolazi do nagomilavanja slobodnog kadmija u bubregu. Kada koncentracija kadmija u bubrežnim kanalici postane previsoka i ne može je pratiti sinteza MT, dolazi do oštećenja i nekroze bubrežnih stanica. Kadmij u jezgri i citoplazmi inhibira enzime u mitohondrijima, remeti aktivacije metaloenzima koji sadrže cink i inhibira sintezu i transkripciju DNA. Oštećene stanice proksimalnih bubrežnih kanalića ne reapsorbiraju u potpunosti proteine, pa se oni pojačano izlučuju u mokraći i dolazi do tzv. proteinurije, koja upućuje na teža oštećenja proksimalnih kanalića bubrega. Prvi znakovi oštećenja bubrega uzrokovanih kadmijem su povećano izlučivanje proteina male molekulske mase,  $\beta_2$ -mikroglobulina,  $\alpha_1$ -mikroglobulina (HC protein) i/ili enzima *N*-acetil- $\beta$ -D-glukozamidaze (NAG). Količina izlučenog  $\beta_2$ -mikroglobulina u mokraći je najčešći rani pokazatelj oštećenja bubrežnih kanalića kadmijem i srazmjerna je ozbiljnosti oštećenja organa. Također je pokazana povezanost izlučenog  $\beta_2$ -mikroglobulina u urinu i doze kadmija (Kjellstrom i sur., 1977). Mjerljive količine  $\beta_2$ -mikroglobulina se javljaju pri koncentraciji kadmija u mokraći od 3,2  $\mu\text{g Cd/g}$  kreatinina, dok se promjene ostalih bjelančevina male molekulske mase javljaju pri koncentracijama kadmija u mokraći  $>10 \mu\text{g Cd/g}$  kreatinina. S obzirom da je nađeno da koncentracija  $\beta_2$ -mikroglobulina u mokraći raste s dobi (Tsuchiya i sur., 1979), kao i da su razine tog proteina povećane u mokraći u bolestima kao što su limfom ili multipli mijelom (Kido i sur., 1991), a koncentracija  $\beta_2$ -mikroglobulina ovisi o pH mokraće, potrebno je dalje tragati za specifičnijim biološkim biljezima ranog otkrivanja oštećenja bubrežnih kanalića povezanih s izloženošću kadmijem. Nakon oštećenja stanica bubrega, povećava se i koncentracija MT u mokraći srazmjerno povećanju razine izloženosti kadmiju (Mitane i sur., 1986). Izlučivanje MT mokraćom je specifičan pokazatelj oštećenja bubrega kadmijem, a MT se u mokraći izlučuje jedino nakon izloženosti toksičnim metalima, kadmiju i živi te bakru i cinku pri visokim, toksičnim razinama izloženosti.

Oštećenja bubrega uzrokovana kadmijem dovode i do promjena u glomerularnoj filtraciji, što se očituje povećanim izlučivanjem proteina visoke molekulske mase poput albumina i transferina u mokraći. Povećane razine kreatinina i  $\beta_2$ -mikroglobulina u serumu također upućuju da je došlo do poremećaja glomerularne funkcije. Friberg (1950) je prvi uočio smanjenu stopu glomerularne filtracije i proteinuriju u radnika izloženih kadmiju u

industriji što je potvrđeno poslije u istraživanjima u profesionalno izloženih osoba i u poljoprivrednika u Japanu izloženima kadmiju iz okoliša (Nordberg i sur., 2002; 2007; 2009). Istraživanja u Europi su pokazala da se znakovi oštećenja bubrega u općem stanovništvu javljaju pri vrijednosti kadmija u mokraći od oko 2 do 3  $\mu\text{g Cd/g}$  kreatinina (Järup, 2003). Smatra se da pri količinama kadmija u bubrežnoj kori od 200  $\mu\text{g Cd/g}$  svježe mase tkiva dolazi do proteinurije (ATSDR, 2012).

Ozbiljnije posljedice kronične izloženosti kadmiju koja dovodi do oštećenja bubrega jesu i povećano izlučivanje kalcija i fosfata u mokraći, što može dovesti do nastanka bubrežnih kamenaca i demineralizacije kostiju zbog njihove resorpcije iz kostiju (Foulkes, 1986). Stvaranje bubrežnih kamenaca uočeno je u radnika profesionalno izloženih kadmiju (Järup, 1998). Ako se osoba ukloni iz područja izloženosti, znakovi kroničnog otrovanja niskim dozama kadmija u bubregu su, u pravilu, reverzibilni. Postepeno se smanjuju izlučivanje kadmija, a poslije i MT, stanice proksimalnih kanalića bubrega se oporavljaju i nakon nekoliko mjeseci normalno reapsorbiraju proteine male molekularne mase (Bernard i Lauwreys, 1986). Međutim u slučajevima ozbiljnih oštećenja bubrega zbog izloženosti visokim dozama kadmija, mogu zaostati ireverzibilne promjene u bubregu (WHO/EHC, 1992; Nordberg i sur., 2007; 2009).

### ***Učinci kadmija u kostima***

Brojna istraživanja u ljudi su pokazala povezanost između profesionalne izloženosti kadmiju i poremećaja u metabolizmu kalcija u smislu nastajanja bubrežnih kamenaca, proteinurije i povećanog izlučivanja kalcija mokraćom (hiperkalciurije), a dugotrajna profesionalna izloženost kadmiju od oko 20 godina ili više može izazvati smanjenu gustoću kostiju i osteoporozu (Järup i sur., 1998; Nordberg i sur., 2007). Smanjena koštana gustoća i povećana učestalost lomova kostiju je opisana i u poljoprivrednika u Kini nakon izloženosti kadmiju konzumiranjem onečišćene riže tijekom više od 30 godina (Nordberg i sur., 2002; Wang i sur., 2003). Kadmij ometa metabolizam kalcija izravno u kostima ili neizravno oštećenjem bubrežnih funkcija (u: Bhattacharyya i sur., 2000).

Kadmij u kostima može izazvati osteomalaciju i osteoporozu. U Japanu je neposredno nakon Drugog svjetskog rata opisana tzv. *itai-itai* bolest, koju je otkrio dr. Noboru Hagino i koja je bila povezana s izlaganjem kadmiju u okolišu (u: Tscuhiya, 1978). U području duž rijeke Jinzu, koje je bilo izrazito onečišćeno kadmijem pojavili su se bolesnici, uglavnom žene starije dobi, koje su imale jake bolove u zglobovima i kostima od čega dolazi i naziv

bolesti *itai-itai* što na japanskom jeziku znači zapomaganje "jao-jao". Radilo se o bolnim deformacijama kostura s povećanim gubitkom koštane mase te učestalim prijelomima kostiju u postmenopauzalnih žena, koje su tijekom reproduktivne dobi imale višestruke trudnoće i porođaje. Uočeni su i poremećaji u bubrežnim funkcijama zbog kronične izloženosti kadmiju. Radilo se o onečišćenju vode kadmijem iz rudnika cinka i olova kojom su natapana rižina polja nizvodno od rudnika. Kadmij nije bio jedini čimbenik razvoja te bolesti već su tome pridonijeli i nedostatna prehrana, koja se uglavnom sastojala od riže, pa je bio smanjen unos proteina, vitamina topljivih u mastima kao i esencijalnih elementa, pogotovo kalcija. Deficijencija esencijalnih elementa je nastala zbog višestrukih trudnoća. *Itai-itai* bolest je 1968. godine bila prva službeno priznata bolest u svijetu nastala zbog onečišćenog okoliša. Njene značajke navedene u literaturi su sljedeće: osteomalacija s osteoporozom, zatajenje bubrega, deficijencija esencijalnih makro- i mikroelemenata i anemija. U tako teškom obliku kao što je bila *itai-itai* bolest takav poremećaj povezan s izlaganjem kadmiju nije se više nikada ponovio nigdje u svijetu. Desetljećima nakon izbijanja, bolest je proučavana u nizu međunarodnih projekata. Na temelju pokusa provedenih na miševima i psima u radovima Bhattacharyya (1991) i Bhattacharyya i suradnici (2000) su pretpostavljeni sljedeći mehanizmi i znakovi učinaka kadmija na kost: inhibicija aktivacije D vitamina u bubregu, učinak na smanjenu apsorpciju kalcija u crijevima koja dovodi do smanjene raspoloživosti kalcija u tijelu i do dekalifikacije kostiju, pojačano izlučivanje kalcija, fosfata i proteina mokraćom te izravan učinak na koštano tkivo remećenjem metabolizma kolagena što dovodi do smanjene mehaničke jakosti i gipkosti kostiju.

Apsorpcija kalcija u crijevima i mineralizacija kostiju ovise o 1,25-dihidroksi-vitaminu D3. Nakon unošenja u organizam, D3 vitamin se u jetri pretvara u neaktivni oblik 25-hidroksi-vitamin D3, koji se zatim u mitohondrijima stanica bubrežnih kanalića pretvara u aktivan oblik 1,25-dihidroksi-vitamin D3. S obzirom da kadmij može oštetiti stanice bubrežnih kanalića, može se smanjiti pretvorba neaktivnog D vitamina u aktivni oblik, doći do smanjene apsorpcije kalcija i smanjene mineralizacije kostiju. To posljedično može dovesti do omekšavanja kostiju, osteomalacije (Carmichael i sur., 1982; WHO/EHC, 1992; Järup, 2003; Bhattacharyya i sur., 2000; Nordberg i sur., 2002; 2007).

### 1.3.3. Kadmij kao uzročnik kroničnih i malignih bolesti

Izloženost kadmiju u niskim ili visokim dozama može dovesti do razvoja drugih kroničnih bolesti poput diabetesa mellitusa, hipertenzije, bolesti perifernih arterija (ateroskleroze), kronične srčane bolesti i srčanog udara, periodontalnih bolesti, ozbiljnih poremećaja vida zbog makularne degeneracije i brojnih malignih bolesti. Opisana je povezanost izloženosti kadmiju i malignih bolesti, leukemije te karcinoma pluća, gušterače, bubrega, mokraćnog mjehura, debelog crijeva, dojke, sluznice maternice (endometrija) i prostate (Järup, 2003; Satarug i Moore, 2004; Godt i sur., 2006; Nordberg i sur., 2007; Satarug i sur., 2010). Međunarodna agencija za istraživanje raka, *International Agency for Research on Cancer*, (IARC) je 1993. godine uvrstila kadmij u skupinu 1 ljudskih kancerogenih tvari. To je bilo temeljeno na epidemiološkim istraživanjima i rezultatima dobivenim na pokusnim životinjama, kojima su pokazane povezanosti izloženosti kadmiju i raka pluća. Napomenuto je da je procjena bila utemeljena na istraživanjima provedenima u radnicima profesionalno izloženima kadmiju pri čemu nije bilo moguće sasvim razdvojiti učinke kadmija od učinaka izloženosti drugim mogućim kancerogenim anorganskim elementima, arsenu i niklu, kao ni istodobne učinke pušenja. Verougstraete i suradnici (2003) su upozorili da su podaci dobiveni nakon profesionalne izloženosti kadmiju do 2003. godine pokazali manji rizik za razvijanje bolesti u skupinama koje su bile izložene samo kadmiju i u odsutnosti arsena i nikla, u odnosu na skupine u kojima su arsen i nikal bili prisutni uz kadmij. Unatoč tome, autori smatraju da su dobiveni podaci dovoljni za uvrštavanje kadmija u A1 skupinu dokazanih ljudskih kancerogenih tvari s čime se do sada slažu i stručnjaci u IARC (1993).

Općenito nema puno istraživanja o učincima kadmija iz okoliša na razvoj raka pluća. Istraživanje koje su proveli Nawrot i suradnici (2006) je pokazalo da postoji povezanost između povećanog rizika za razvoj raka pluća i izloženosti kadmiju iz okoliša. Autori su u obradu uključili podatke o izlučivanju kadmija mokraćom, a u obzir su uzeli i podatke o pušenju i izloženosti arsenu. Iako je to istraživanje potvrdilo da kadmij može imati kancerogene učinke zbog izloženosti iz okoliša, potrebna su daljnja istraživanja koja bi to potvrdila. Istraživanja na štakorima su pokazala da izloženost kadmiju udisanjem dovodi do razvoja raka pluća u ovisnosti o dozi (Takenaka i sur., 1983; Jin i sur., 2002; Waalkes, 2003).

Pokazana je povezanost izloženosti kadmiju i raka bubrega (Kolonel, 1976; Mandel i sur., 1995), mada sva istraživanja to nisu potvrdila. Povećani rizik za nastajanje raka u stanicama bubrega nađen je u ljudi profesionalno izloženih kadmiju. Pokazano je da žene imaju veći rizik za razvoj raka u stanicama bubrega u odnosu na muškarce nakon izlaganja

visokim dozama kadmija zbog većeg unosa i nakupljanja kadmija u žena u odnosu na muškarce (Pesch i sur., 2000). Hu i suradnici (2002) su našli povezanost rizika za nastajanje raka u stanicama bubrega s duljinom izloženosti kadmiju u muškaraca što nije bilo potvrđeno u žena, jer ih je premalen broj bio izložen kadmiju.

Iako su objavljeni podaci o povezanosti kadmija s povećanim rizikom za nastanak raka prostate u radnika izloženih kadmiju (Kipling i Waterhouse, 1967), to nije potvrđeno u svim epidemiološkim istraživanjima (Kazantzis i sur., 1988). U istraživanju provedenom na štakorima (Wistar) je uočeno da potkožno ubrizgavanje kadmijevog klorida može izazvati rak prostate, da visoke doze kadmija mogu uzrokovati nekrozu testisa što može dovesti do malignog tumora na mjestu ubrizgavanja kadmija i da razvoj raka prostate ovisi o nastajanju testosterona u testisima (Waalkes i sur., 1988). Učinci kadmija na ekspresije MT, gena *p53* i protoonkogeni mogu biti važni za razvoj raka prostate i testisa u štakora (Arisawa i sur., 2001; Nishijo i sur., 1995). U istraživanjima *in vitro* je nađeno da ponavljana izloženost kadmiju može uzrokovati maligne promjene u epitelnim stanicama ljudske prostate (Achanzar i sur., 2001; Nakamura i sur., 2002). U stanovnicima područja onečišćenog kadmijem u Kini su nađena oštećenja prostate te povezanost razine kadmija u mokraći i povećanih razina specifičnog antigena prostate (PSA) u serumu (Zeng i sur., 2004). Osim kadmija, čimbenici rizika za razvoj raka prostate su pretilosti i unos životinjskih masti i crvenog mesa, dok konzumiranje povrća, žitarica i D vitamina imaju zaštitnu ulogu (Ekman, 1999). Pokazano je da su muškarci koji nisu svakodnevno unosili dovoljno cinka u organizam imali povećane koncentracije kadmija u mokraći i povećan specifični antigen PSA (van Wijngaarden i sur., 2008). Zanimljivo istraživanje je pokazalo 4,7 puta povećanu mogućnost za nastajanje raka prostate u ljudi koji su imali  $>0,03 \mu\text{g Cd/g}$  nokta nožnog prsta u odnosu na ljude s količinama  $<0,007 \mu\text{g Cd/g}$  nokta (Vinceti i sur., 2007).

Povećan rizik za razvoj raka dojke je nađen u trudnica koje su počele pušiti unutar 5 godina nakon prve menstruacije kao i u žena koje nisu nikada rodile i koje su pušile više od 20 cigareta na dan ili  $>20$  kutija cigareta na godinu (Band i sur., 2002). Mc Elroy i suradnici (2006) su uočili povezanost između razvoja raka dojke i izloženosti kadmiju, koja je bila 2,29 puta veća u žena koje su imale  $>0,58 \mu\text{g Cd/g}$  kreatinina u odnosu na žene s  $<0,26 \mu\text{g Cd/g}$  kreatinina u mokraći. U štakoricama koje su bile izložene kadmiju opaženo je povećanje mliječnih žlijezda u odnosu na neizložene štakorice. Te promjene su uočene i u štakorica kojima su odstranjeni jajnici i dokazano je da kadmij oponaša djelovanja estrogena u dojkama štakorica (Johnson i sur., 2003). Stoga se kadmij može smatrati tzv. metaloestrogenom. U

žena koje su unosile više od prosječne vrijednosti kadmija na dan ( $>15 \mu\text{g Cd}$ ) je nađen 2,9 puta veći rizik za razvoj raka endometrija (Åkesson i sur., 2008).

Povećane vrijednosti kadmija u serumu i izloženost kadmiju tijekom poljoprivrednih aktivnosti mogu se povezati s rizikom nastajanja raka gušterače (Kriegel i sur., 2006). Rak debelog crijeva je uočen najviše u ljudi s genetskim poremećajima u popravku krivo sparenih baza. U kvascima u kojima je popravak krivo sparenih baza bio smanjen niskim dozama kadmija, uočeno je 2000 puta više mutacija (Jin i sur., 2003). Izloženost stanica debelog crijeva kadmiju preko žuči i stolice u ljudi koji prehranom unose visoke količine kadmija može utjecati na razvoj raka debelog crijeva. Pokazano je da D vitamin ima zaštitnu ulogu u razvoju raka debelog crijeva kao i raka prostate (Lamprecht i Lipkin, 2003).

Iako molekularni mehanizmi učinaka kadmija na razvoj malignih bolesti nisu do kraja razjašnjeni, definirano je nekoliko čimbenika koji tome pridonose: pojačanje mitogenih signala, ometanje mehanizama popravka DNA i otpornost stanica na apoptozu zbog izloženosti kadmiju (Goyer i sur., 2004). Najnovija istraživanja su pokazala da kadmij može mijenjati konformaciju E-kaderina, transmembranskog glikoproteina koji veže kalcij i koji ima važnu ulogu u adheziji stanica, posebno u pokrovnim stanicama kože (epidermisu). Ta otkrića upućuju da bi E-kaderin mogla biti ciljna molekula za toksične i kancerogene učinke kadmija (Prozialeck i Lamar, 1999).

## 1.4. Esencijalni elementi i njihova međudjelovanja s kadmijem

### 1.4.1. Željezo i kadmij

Željezo je važan esencijalan metal u organizmu s ulogama u brojnim biološkim funkcijama uključujući prijenos i skladištenje kisika, prijenos elektrona, sintezu DNA i enzimske oksido-redukcijske reakcije. Zbog svega toga je uloga željeza nužna za rast, razvoj i preživljavanje organizma. Željezo je u hem i ne-hem obliku prisutno u svim stanicama organizma. U tijelu odraslog muškarca ima 55 mg željeza, dok u tijelu odrasle žene ima 45 mg željeza na kilogram tjelesne mase (Ponka i sur., 2007; Piasek i Mikolić, 2009). Od organa, najveći dio željeza se nalazi u jetri (30%), a ostalo je u koštanoj srži, slezeni, mišićima i sluznici crijeva (Gallagher, 2008). Većina željeza u organizmu (60 do 70%) se nalazi u eritrocitima vezana za hemoglobin. Hem željezo je sastojak dvaju životno važnih proteina, hemoglobina u eritrocitima i mioglobina u mišićnim stanicama. Uloga hemoglobina je važna u prijenosu plinova, kisika od pluća do tkiva i ugljičnog dioksida od tkiva do pluća preko kojih se izdiše, dok je mioglobin skladišni oblik kisika u mišićima.

U namirnicama je željezo prisutno u dva oblika, ne-hem željezo koje se nalazi u namirnicama biljnog i životinjskog podrijetla i hem željezo, koje je prisutno samo u namirnicama životinjskog podrijetla. Apsorpcija hem željeza u organizmu je visoka i iznosi 15-35%, dok je apsorpcija ne-hem željeza samo oko 10% i ovisi o ravnoteži inhibitora i pojačivača apsorpcije željeza u hrani kao i o tjelesnim zalihama željeza u organizmu (Zimmermann i Hurrell, 2007; Hurrell i Egli, 2010). Apsorpciju ne-hem željeza iz hrane smanjuju oksalna kiselina u špinatu i čokoladi, fitinska kiselina u mekinjama i leguminozama, tanin u čajevima, polifenoli u kavi i crnom čaju i kalcijev karbonat kao dodatak prehrani (Mahan i Escott-Stump, 2008). Životinjska tkiva olakšavaju apsorpciju ne-hem željeza, dok proteini poput albumina, proteina mlijeka i proteina jaja djeluju kao inhibitori apsorpcije željeza u crijevima. Askorbinska kiselina (C vitamin) pospješuje i olakšava apsorpciju željeza redukcijom feri u fero oblik i svojstvom keliranja željeza (Hurrell i Egli, 2010). U normalnim uvjetima iz hrane se apsorbira otprilike 1 mg željeza na dan, a ravnoteža ukupnog željeza u organizmu se održava gubitkom oko 1 mg željeza na dan (Ponka i sur., 2007).

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, 2001), pomanjkanje željeza je najčešća prehrambena deficijencija u svijetu i rasprostranjeno je i u nerazvijenim i u razvijenim zemljama. Najčešće se javlja u djece do 14. godine života i u žena tijekom reproduktivnog razdoblja, posebno u trudnica i dojilja. U djece je nedostatak željeza najčešće

posljedica nedovoljnog unosa željeza hranom, posebice u razdoblju kada majčino mlijeko više nije dostatan izvor željeza u postnatalnoj dobi. Neodgovarajući unos željeza hranom, gubitak željeza krvarenjima, visoki unos prehrambenih vlakana kao i višestruke trudnoće su glavni uzroci pomanjkanja željeza u žena, uključujući razdoblja trudnoće i laktacije. Tijekom trudnoće se potrebe za željezom povećavaju na oko 1 g na dan. Za fetus i posteljicu je potrebno oko 300 mg, za povećanu masu eritrocita 500 mg, a izlučuje se oko 200 mg željeza na dan (Merck Manual, 2012). U muškaraca i postmenopauzalnih žena je smanjenje željeza često povezano s krvarenjem u želučanocrijevnom sustavu i njegova se želučanocrijevna apsorpcija općenito smanjuje u starijoj dobi, dok su u žena reproduktivne dobi najčešći uzroci smanjenja željeza menstrualna krvarenja i gubitak krvi tijekom porođaja (Ponka i sur., 2007).

Nedostatak željeza tijekom trudnoće može imati štetne posljedice i za majku i za fetus. Djeca majki s pomanjkanjem željeza tijekom trudnoće imaju povećane izgleda rođenja prije roka i sa smanjenom porođajnom težinom (Allen, 2000) kao i sa smanjenim količinama željeza u jetri (Singla i sur., 1985). Istraživanja na pokusnim glodavcima *in vivo* su pokazala da manji nedostatak majčinog željeza nije utjecao na broj i tjelesne mase fetusa kao ni na masu posteljica (Sherman i Moran, 1984) dok je veliki nedostatak željeza tijekom graviditeta bio povezan sa smanjenim tjelesnim masama majki, plodnosti i preživljavanjem fetusa (Tojyo, 1983). Nedostatak željeza u štakorica je utjecao i na smanjene tjelesne mase njihovih fetusa koji su imali i nedovoljne količine željeza, niži hematokrit i niže razine željeza u jetri (Gambling i sur., 2002). Posljedice nedovoljne količine željeza u majke mogu biti dugotrajne i teško nadoknadive te mogu štetno utjecati na razvoj djeteta i u postnatalnom razdoblju. Istraživanja su pokazala štetne učinke na razvoj i funkcije dječjeg mozga pri čemu ni nadoknađivanje željeza dodacima u prehrani nije umanjilo nepovoljne posljedice smanjenih količina željeza u prenatalnom razdoblju (Lozoff, 2006).

Dugotrajni učinci nedostatka majčinog željeza na zdravlje potomaka proučavani su u eksperimentalnim i epidemiološkim istraživanjima devedesetih godina prošloga stoljeća. Pokazano je da prehrana i količine željeza u organizmu majke mogu utjecati na tjelesnu masu novorođenčeta te da postoji povezanost snižene tjelesne mase novorođenčeta i povećanog rizika za razvoj srčanih i krvožilnih bolesti, pretilosti, moždanog udara, diabetesa mellitusa, malignoma i depresije u odrasloj dobi (Gambling i sur., 2011).

Perinatalno pomanjkanje željeza je ozbiljan zdravstveni poremećaj koji može utjecati na rast, razvoj i funkcije organa prije i nakon rođenja. Djeca sa smanjenim količinama željeza u perinatalnom razdoblju predstavljaju rizičnu skupinu za razvoj pomanjkanja željeza tijekom cijelog razdoblja djetinjstva, ali i u odrasloj dobi. Također prevelike količine željeza u



perinatalnom razdoblju mogu biti štetne za razvoj organa jer je željezo i element s nepovoljnim prooksidacijskim djelovanjem (Rao i Georgieff, 2007).

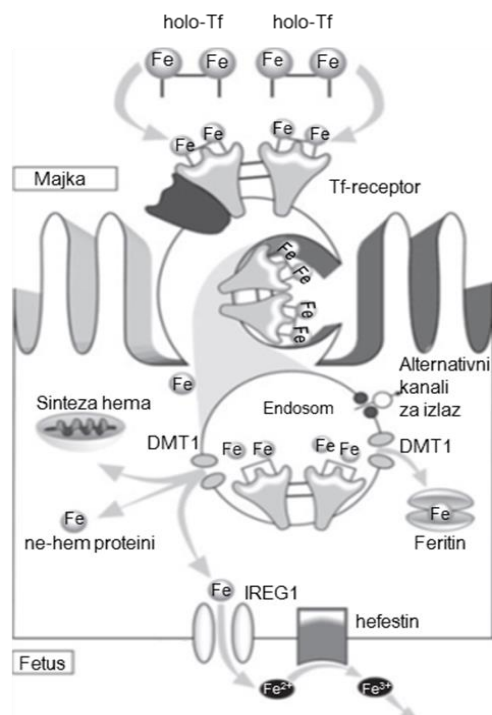
Mutacije u genima koji kodiraju proteine ključne u metabolizmu određenog metala uzrokuju ozbiljne genetske poremećaje. U slučaju željeza su to nasljedni poremećaji i bolesti kao hemokromatoza, razni oblici talasemija i aceruloplazminemija. Hemokromatoza je autosomalan recesivan nasljedni poremećaj metabolizma željeza kod kojega dolazi do povećanog unosa željeza u crijevima s posljedičnim nakupljanjem toksičnih razina željeza u tzv. parenhimnim organima, jetri, gušterači i srcu što može dovesti do ciroze, diabetesa mellitusa i poremećaja srčanih funkcija. U tijelu je razina željeza regulirana na razini crijevne apsorpcije povećanim odnosno smanjenim unosom u ovisnosti o tjelesnim zalihama željeza. Oštećenja u tkivima se uočavaju tek nakon što količine željeza postanu 20 do 50 puta veće od normalnih vrijednosti. Bolest se najčešće može otkriti tek između 40. i 60. godine života mada se u literaturi mogu pronaći podaci i o neonatalnoj hemokromatozi, kao i o hemokromatozi u djece i mladih ljudi. Poremećaj se javlja češće u muškaraca negoli u žena, što se može objasniti različitostima u stupnju želučanocrijevne apsorpcije željeza ovisno o spolu zbog redovitih gubitaka željeza menstrualnim krvarenjima u žena (Ponka i sur., 2007).

Nekoliko je vrsta bolesti nazvanih talasemija, ovisno o težini bolesti. Talasemija nije poremećaj u metabolizmu željeza, nego je to genetski poremećaj u sintezi jednog ili više globinskih lanaca hemoglobina zbog čega dolazi do prekomjernog nakupljanja željeza u različitim organima, prvo u jetri i slezeni te u srčanom mišiću. Najčešći klinički oblici talasemija su  $\alpha$  i  $\beta$  talasemija. Nakupljanja željeza su češća u odraslih osoba koje boluju od  $\alpha$  talasemije. Aceruloplazminemija je nasljedni autosomalan recesivni poremećaj kod kojega zbog mutacija na genu za ceruloplazmin dolazi do nakupljanja željeza u različitim tkivima i organima, uključujući jetru, gušteraču (Langerhansove otočiće) i mozak, u bazalnim ganglijima, mikroglija stanicama i neuronima. Istraživanja su pokazala da ceruloplazmin ima ključnu ulogu u metabolizmu željeza jer sudjeluje u oksidaciji željeza iz fero u feri oblik što omogućava vezanje željeza na prijenosni protein transferin. U odsutnosti ceruloplazmina željezo se brzo uklanja iz krvotoka i nakuplja u jetri i drugim organima. U pacijenata oboljelih od aceruloplazminemije uočene su neurološke promjene, diabetes mellitus i degenerativne promjene na mrežnici (DiDonato i Sarkar, 2000; Ponka i sur., 2007).

Kako je već prije spomenuto, danas su dobro poznata međudjelovanja željeza i kadmija, koja mogu nastati na razini želučanocrijevne apsorpcije obaju metalnih iona zbog njihovog natjecanja za ista vezna mjesta zajedničkih prijenosnika DMT1 i MTP1 u dvanaesniku. Na ekspresiju tih prijenosnika utječu unos i stanje željeza u organizmu te unos

kadmija u crijevima. U uvjetima nedostatka željeza je pojačana ekspresija DMT1 i MTP1 prijenosnika u crijevima što utječe na povećanu apsorpciju kadmija u želučanocrijevnom sustavu i posljedično veći prijenos kadmija krvotokom do unutrašnjih organa (Park i sur., 2002; Bressler i sur., 2004; Ryu i sur., 2004; Bridges i Zalups, 2005; Martelli i sur., 2006; Kim i sur., 2007; Thevenod, 2010). Osobe čije su rezerve željeza u tijelu smanjene mogu unositi povećane količine kadmija u organizam. To su uglavnom žene u reproduktivnoj dobi i djeca u razvoju u kojih su povećane fiziološke potrebe za esencijalnim elementima (Åkesson i sur., 2002; Piasek i sur., 2004; 2007; Kippler i sur., 2007; 2009). Zbog toga žene starije dobi imaju veće količine kadmija u tijelu u odnosu na muškarce jednake dobi (Järup i sur., 1998; Nordberg i sur., 2007). Obrnuto postoji također utjecaj kadmija na prijenos željeza u crijevima. U istraživanju provedenom na Caco-2 stanicama (ljudskim stanicama raka debelog crijeva) je pokazano da je unos željeza prijenosnikom DMT1 bio inhibiran visokom dozom od 500  $\mu$ M kadmija (Bannon i sur., 2003).

Prilikom prijenosa elemenata kroz posteljicu može doći do međudjelovanja kadmija i željeza pri čemu kadmij nakupljen u posteljičnom tkivu može ometati prijenos željeza do fetusa. Moguće štetne posljedice su nedostatak željeza u fetalnom i postnatalnom razdoblju i nastanak anemije nakon rođenja (Carmichael i sur., 1982; Piasek i sur., 2004; 2007; Kippler i sur., 2010). U hemokorijalnim posteljicama, kao što su i ljudska, i štakorska posteljica, trofoblast je u izravnoj vezi s majčinim krvotokom. Kako je shematski prikazano na slici 1, na temelju dosadašnjih saznanja se smatra da se željezo vezano na transferin (Tf) u krvotoku majke veže za Tf receptore na apikalnoj membrani sinciciotrofoblasta i čitav kompleks ulazi u posteljicu pomoću vezikula u procesu endocitoze. Ulaskom protona u vezikule snižava se pH vrijednost na 5,5, željezo se odvaja od Tf i pomoću endosomalne reduktaze se trovalentno (feri) željezo reducira u topljivije dvovalentno (fero) željezo. Reducirani oblik željeza izlazi iz vezikula u citosol pomoću prijenosnika DMT1, a Tf i Tf receptor se vraćaju na površinu stanice. Iz sinciciotrofoblasta željezo izlazi kroz bazolateralnu membranu pomoću feroportina (FPN1 ili IREG1) u dvovalentnom obliku nakon čega se natrag oksidira u trovalentno željezo pomoću hefestina (bakarne oksidaze) i veže na fetalni transferin (McArdle i sur., 2008; Carter, 2012).



**Slika 1.** Shematski prikaz prijenosa željeza kroz ljudsku i štakorsku posteljicu (preuzeto iz: McArdle i sur., 2008)

U istraživanjima *in vivo* i *in vitro* Gambling i suradnici (2001) su pokazali da nedostatak željeza u pokusnih štakorica utječe na povećanu ekspresiju proteina za prijenos željeza kroz posteljicu. Opazili su povećane ekspresije Tf receptora i DMT1 na razini mRNA i proteina u pokusima na gravidnim štakoricama koje su hranjene krmivom sa smanjenom količinom željeza. Ekspresija FPN1 je bila nepromijenjena. Također je zbog nedostatka željeza i posljedično povećane ekspresije Tf receptora nađen povećan unos željeza u ljudskim stanicama koriokarcinoma, takozvanim BeWo stanicama. Rezultati tog istraživanja pokazuju da nedostatak željeza u budućoj majki dovodi do promjena u prijenosu željeza kroz posteljicu kojima se ublažava nedostatak željeza u fetusu. Navedena otkrića su potvrdila pretpostavku da smanjene količine željeza u organizmu majke mogu uzrokovati nedostatak željeza u fetusu, iako u manjoj mjeri negoli je njegov manjak u organizmu trudnice. To je zato što se tijekom trudnoće zalihe željeza prvenstveno troše za opskrbu fetusa i do kraja trudnoće se >70% željeza unesenog hranom prenosi u fetus (Gambling i sur., 2002). Također je nađeno da razine željeza u jetri fetusa reguliraju ekspresiju Tf receptora u posteljici što utječe na unos željeza iz majčine krvi (Gambling i sur., 2009).

Mehanizam prijenosa željeza kroz stanice trofoblasta pomoću DMT1 još uvijek nije do kraja razjašnjen. U nizu pokusa na knock-out miševima Gunshin i suradnici (2005) su pokazali da DMT1 (SLC11A2) nije neophodan za prijenos željeza do fetusa. Slično su Hojyo i suradnici (2011) istraživali ulogu transmembranskog prijenosnika željeza ZIP14 (SLC39A14) u prijenosu željeza kroz posteljicu i pokazali da su okoćeni knock-out miševi imali dovoljne količine željeza što upućuje na zaključak da ni taj prijenosnik nije imao ključnu ulogu u prijenosu željeza do fetusa. Ti rezultati pokazuju da postoje neki drugi neotkriveni prijenosnici kojima se željezo prenosi kroz posteljicu. Najvjerojatniji mehanizam pri tome bi mogao biti pomoću prijenosnika ZIP8, koji prenosi cink i zastupljen je u velikoj mjeri i u posteljici, a otkrili su ga Begum i suradnici (2002). Wang i suradnici (2011) su pokazali na Zip8 knock-out miševima da je prijenosnik ZIP8 nužan za razvoj u najranijoj dobi, budući da nakon smanjene ekspresije ZIP8 u posteljici, žumanjčanoj vreći i fetusu homozigotnih miševa životinje nisu preživjele nakon okoćenja. Zbog prisutnosti ZIP8 prijenosnika u mnogim organima, uključujući pluća, posteljicu, gušteraču, jetru, bubrege i druge, pretpostavlja se da bi taj prijenosnik mogao sudjelovati i u metabolizmu željeza u tim organima (Jenkitkasemwong i sur., 2012; Wang i sur., 2012).

#### 1.4.2. Cink i kadmij

Cink je esencijalan mikroelement koji je široko rasprostranjen u okolišu. Prvi rezultati o esencijalnosti cinka su dobiveni u istraživanju u kojem je pokazana važnost cinka za rast gljivice *Aspergillus Niger*. Nakon toga su provedena istraživanja na biljkama i laboratorijskim životinjama o ulogama cinka u fiziološkim funkcijama (Prasad, 1979). Prije pedeset godina su prepoznate prve posljedice nedostatka cinka u ljudskom organizmu i to upravo na rast djece. Nakon toga su uslijedila druga brojna istraživanja o važnosti cinka za ljudsko zdravlje (u: Salgueiro i sur., 2000; Sanstead i Au, 2007).

Cink je dio >300 enzima preko kojih sudjeluje u sintezi i razgradnji ugljikohidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Međudjeluje s drugim mikronutrijentima s kojima je u homeostazi. Cink stabilizira molekulske strukture staničnih dijelova i membrana te tako održava cjelovitost stanica, tkiva i organa. Ima esencijalnu ulogu u ekspresiji gena, sastojak je mnogih proteina i ima ključnu ulogu u cjelokupnom metabolizmu organizma (Salgueiro i sur., 2000; FAO/WHO, 2001; Piasek i Mikolić, 2009). U enzimima i proteinima se cink nalazi u obliku tioneina, proteina koji se sastoji od 60 do 68 aminokiselina i u kojem 20 aminokiselina cisteina veže sedam iona cinka u dva klastera što dovodi do nastanka MT. Metalotionein je redoks aktivan i njegovi sulfhidrilni ligandi vežu cink. Osim uloge u skladištenju cinka i vezanja slobodnih iona cinka, MT je važan i za dostupnost cinka koji se tako može vezati na enzime i proteine (Maret, 2004).

Cink u jezgri stanica ima važnu ulogu u održavanju genetske stabilnosti i ekspresije gena jer sudjeluje u procesima diferencijacije, proliferacije i apoptoze stanice (Maret i Sanstead, 2006). Jedna od najvažnijih uloga cinka je antioksidacijska zaštita bioloških struktura od oksidacijskog stresa i oštećenja slobodnim radikalima (Salgueiro i sur., 2000). To se može odvijati na nekoliko načina: 1) smanjenjem produkcije hidroksilnih radikala zbog natjecanja cinka sa željezom i bakrom koji kataliziraju nastajanje hidroksilnih radikala; 2) održavanjem optimalnih razina MT tako što cink potiče nastajanje MT, koji djeluje kao „hvatač“ slobodnih radikala; 3) kao bitan sastojak antioksidacijskog enzima Cu/Zn SOD i 4) kao zaštitna komponenta u kompleksu sa sulfhidrilnim i drugim kemijskim skupinama (Salgueiro i sur., 2000; Formigari i sur., 2007; Prasad i sur., 2008).

Preporučeni dnevni unos cinka iznosi 11 mg za muškarce i 8 mg za žene (Maret i Sandstead, 2006). U tijelu odraslog muškarca čija je tjelesna masa 70 kg nalazi se 2 do 3 g cinka što je 30 do 40 mg Zn/kg tjelesne mase, dok su u žena te količine cinka u tijelu manje. Količina cinka je otprilike upola manja od količine željeza u organizmu. Većina cinka u

organizmu se nalazi u mišićima (60%), zatim u kostima (30%), koži i kosi (8%), jetri (5%), želučanocrijevnom sustavu i gušterači (3%) i u ostalim organima (<1%) (Wastney i sur., 1986).

Na unos cinka u organizam utječu količine cinka u organizmu i apsorpcija u crijevima jer se u uvjetima povećanih količina cinka u hrani stopa želučanocrijevnog apsorpcije smanjuje zbog zasićenja prijenosnih mehanizama za cink. Hrana sa smanjenim razinama cinka, obrnuto, povećava apsorpciju cinka u crijevima u svim dobnim skupinama, što je regulirano homeostatskim mehanizmima (Lönnerdal, 2000). Apsorpcija cinka je homeostatski regulirana i odstranjivanjem cinka u stolici (Ziegler i sur., 1989).

Istraživanja u ljudima u kojima je apsorpcija cinka iz jednog obroka iznosila oko 18 do 20  $\mu\text{mol}$ , dok je apsorpcija cinka iz vodene otopine bila 80 do 100  $\mu\text{mol}$ , pokazuju da se crijevna apsorpcija cinka razlikuje ovisno o tome je li cink unesen hranom ili vodenim otopinama (Lönnerdal, 2000). Izbjegavanje unosa crvenog mesa i veganska prehrana povećavaju rizik za pomanjkanje cinka u organizmu. Proteini su glavni izvor cinka u prehrani, a povećan unos proteina prehranom dovodi do povećanog unosa i veće biološke dostupnosti cinka (Lönnerdal, 2000). Biološka dostupnost cinka iz hrane ovisi i o drugim sastojcima hrane kao što su netopljiva vlakana, lignin, fitati i produkti Maillardovih reakcija, koji svi vežu cink i tako sprječavaju apsorpciju cinka u crijevima (Maret i Sandstead, 2006). Također pojedina vrsta proteina može utjecati na biološku dostupnost cinka; životinjski proteini (govodina, jaja, mliječni sir) mogu smanjivati inhibitorni učinak fitata na apsorpciju cinka, a kazein iz mlijeka smanjuje crijevnog apsorpciju cinka (Lönnerdal, 2000). Kalcij iz mlijeka također može spriječiti apsorpciju cinka (Wood i Zheng, 1997) i stvaranjem netopljivih kompleksa s fitatima pojačati negativan učinak fitata na apsorpciju cinka (Ferguson i sur., 1989). Rezultati istraživanja o učincima suplementacije željezom tijekom duljeg razdoblja koji mogu dovesti do zasićenja i utjecati na mehanizme unosa i prijenosa cinka su različiti. Toksične razine kadmija mogu utjecati na crijevnog apsorpciju cinka, ali nije poznato na koji način niže razine kadmija u određenoj hrani utječu na apsorpciju cinka u ljudi. Na apsorpciju cinka utječu i različita fiziološka stanja u kojima su povećane potrebe za cinkom kao što su trudnoća i dojenje, odnosno tijekom razdoblja povećanog rasta i razvoja u djece (Lönnerdal, 2000).

Već je prije opisano da je homeostaza cinka u organizmu regulirana procesima tijekom unosa egzogenog cinka i odstranjivanjem endogenog cinka stolicom. Najnovija istraživanja pokazuju da se ravnoteža cinka na staničnoj razini održava pomoću 14 prijenosnika iz ZIP obitelji proteina koji reguliraju ulaz cinka u stanice i 10 prijenosnika iz obitelji cinkovih prijenosnika ZnT koji reguliraju njegov izlaz iz stanica (Fukada i Kambe, 2011). Od svih tih

prijenosnika je najjasnija uloga ZIP 4 proteina koji se nalazi na luminalnoj površini enterocita gdje posreduje u prijenosu cinka unesenog hranom (Andrews, 2008). Istraživanje koje su proveli Wang i suradnici (2002) je pokazalo da mutacija gena *ZIP4* uzrokuje nedostatak cinka i dovodi do nastajanja metaboličkog poremećaja tzv. *acrodermatitis enteropathica* čije su glavne značajke usporeni rast i razvoj te upalne promjene na koži oko prirodnih otvora (usta i čmar) i na udovima, gubitak kose i proljev. Pomanjkanje cinka u tih bolesnika uspjelo se nadoknaditi peroralnom suplementacijom cinkom što upućuje na zaključak da postoje i drugi mehanizmi prijenosa cinka u crijevima. Budući da se apsorpcija cinka u želučanocrijevnom sustavu odvija u tankom crijevu, najviše u dvanaesniku i ileumu (Krebs, 2000), postoji mogućnost da prijenosnici ZIP8 i ZIP14 imaju ulogu „rezervnih“ prijenosnika cinka s obzirom na to da se oba nalaze na luminalnoj membrani epitelnih stanica dvanaesnika (He i sur., 2006; Girijashanker i sur., 2008). Uloga MT u apsorpciji cinka u crijevima do sada nije razjašnjena (Krebs, 2000; Salgueiro i sur., 2000).

Pomanjkanje cinka je prisutno u oko 20% stanovništva diljem svijeta i moguće i u zemljama u razvoju, i u razvijenim zemljama. Nedostatak cinka se javlja u osoba čija prehrana ne sadrži dovoljne količine cinka ili sadrži tvari koje smanjuju biološku dostupnost tog mikroelemenata. Drugi niz razloga nedostatka cinka u organizmu mogu biti bolesti koje smanjuju apsorpciju cinka u crijevima i/ili povećavaju njegov gubitak kao što su kronične bolesti crijeva i jetre. Kronična krvarenja, pojačano izlučivanje cinka u mokraći kod nekih bubrežnih bolesti, ciroza jetre, kronični alkoholizam, stres, pojačani katabolizam i kronične upalne bolesti koje povisuju razine interleukina-1 jesu stanja koja mogu također utjecati na pomanjkanje cinka u organizmu (Sandstead i Au, 2007). Rizične skupine za nedovoljan unos cinka u organizam jesu: novorođenčad, djeca, adolescenti te trudnice i dojilje zbog povećanih potreba za unosom cinka koji se prenosi u fetus odnosno novorođenče. Klinička slika ozbiljnog pomanjkanja cinka u ljudi je usporeni rast, zakašnjeni razvoj spolnih žlijezda i kostiju, proljevi, gubitak kose, gubitak apetita, povećana osjetljivost na razne upalne procese zbog narušenih funkcija imunosnog sustava i promjene u ponašanju. Pokazatelji blagog nedostatka cinka u organizmu su vidljivi u poremećajima rasta i imunosnog odgovora, dok su poremećena osjetila okusa i sporo zacjeljivanje rana uočeni u nekoliko istraživanja (FAO/WHO, 2001). Suvišak cinka u organizmu je rijedak zbog dobre homeostaze cinka u organizmu. Ako dođe do otrovanja cinkom povećanim akutnim ili kroničnim unosom cinka peroralnim putem (najčešće aditivima u hrani), mogu nastati učinci na imunosni odgovor vjerojatno inhibicijom apsorpcije željeza ili bakra zbog sličnih kemijskih i biokemijskih karakteristika tih elementa (Briefel i sur., 2000). Simptomi akutnoga otrovanja cinkom jesu

tahikardija, vaskularni šok, mučnina, povraćanje, proljevi i oštećenja parenhima gušterače i jetre (Kamenczak i sur., 1990).

Istraživanja provedena na pokusnim životinjama i u ljudi su pokazala ključnu važnost cinka za razvoj ploda u maternici kao i djeteta nakon rođenja. Cink je naročito potreban u prvim godinama života zbog ubrzanog rasta (Fung i sur., 1997). Zbog važne uloge cinka u brojnim biokemijskim putovima koji epigenetski mogu utjecati na molekulu DNA i histone, nedostatak cinka u fetalnom razdoblju može predstavljati opasnost za razvoj bolesti u odrasloj dobi (Maret i Sandstead, 2008). Nedostatak cinka u perinatalnom razdoblju može imati ozbiljne štetne posljedice jer je cink nužan za normalan rast i razvoj fetusa, razvoj imunosnog sustava, kao i za nastajanje mlijeka tijekom dojenja (Wellingtonhausen, 2001; Salgueiro i sur., 2002). Pomanjkanje cinka tijekom perinatalnog razvoja može imati posljedice i u odrasloj dobi (Keen i sur., 2003). Istraživanja na pokusnim miševima su pokazala da su poremećaji u imunosnom sustavu koji su nastali zbog nedostatka cinka tijekom graviditeta uočeni u drugoj i trećoj generaciji potomaka (Beach i sur., 1982). Istraživanja provedena na laboratorijskim životinjama su pokazala povezanost cinka i metabolizma kostiju jer cink pojačava učinak D vitamina stimuliranjem sinteze DNA u koštanima stanicama (Brandão-Neto, 1995).

Cink može utjecati na rast na nekoliko načina: promjenama u apetitu i osjetima mirisa i okusa što može utjecati na unos hrane u organizam; djelovanjem na sintezu DNA i RNA što utječe na replikaciju i diferencijaciju stanica hondrocita, osteoblasta i fibroblasta, transkripciju stanica i sintezu somatomedina C, kolagena, osteokalcina i alkalne fosfataze; djelovanjem na metabolizam ugljikohidrata, lipida i proteina; sudjelovanjem u sintezi i izlučivanju hormona rasta te njegovom djelovanju na sintezu somatomedina C u jetri i aktivaciju somatomedina C u koštanoj hrskavici; djelovanjem na D vitamin i hormone štitnjače, inzulina i testosterona koji su neizravno povezani s rastom (Salgueiro i sur., 2002). Zastoj rasta fetusa u maternici je jedna od veoma važnih posljedica nedostatka cinka tijekom trudnoće čime se mogu povećati mogućnosti za obolijevanja i smrtnost novorođenog djeteta. Teratogeni učinci cinka zbog pomanjkanja cinka u prehrani tijekom graviditeta su nađeni u brojnim vrstama pokusnih životinja uključujući miševе, štakore, ovce, kokoši i žabe (Keen, 1996; Falchuk i Montorzi, 2001). Istraživanja na pokusnim štakorima su pokazala da prehrana deficijentna cinkom tijekom skotnosti dovodi do poremećaja razvoja unutrašnjih organa. Posljedice pomanjkanja cinka na razvoj nastaju na dva načina: 1) istraživanja na štakorima *in vivo* su pokazala da nakon akutnog nedostatka cinka u prehrani koncentracija cinka u serumu štakorice pada i ne može zadovoljiti potrebe ploda; 2) istraživanja *in vivo* i *in vitro* su pokazala da promjene u koncentraciji cinka brzo dovode do promjena u metabolizmu stanice uključujući porast



oksidacijskog stresa, pomaka u redoks stanju, povećanog DNA vezanja aktivator proteina-1 (AP-1), smanjene aktivnosti vezanja nuklearnog faktora- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), poremećene funkcije mitohondrija i konačno do apoptoze stanice (Oteiza i sur., 2000; Duffy i sur., 2001). Nedostatak cinka u djece se danas javlja sve češće, pogotovo u zemljama u razvoju gdje je dostupnost cinka prehranom manja što uzrokuje brojne ozbiljne posljedice uključujući zastoj u rastu, porast incidencije zaraznih bolesti i kognitivne poremećaje (Salgueiro i sur., 2002).

Međudjelovanja kadmija i cinka su rezultat kemijske sličnosti tih dvaju metala i moguća su na ovim razinama: apsorpcija u crijevu, raspodjela u organizmu, odstranjivanje iz tijela i u raznim biološkim ulogama cinka. Oba metala pripadaju istoj skupini u periodnom sustavu elemenata i imaju jednaki elektronski naboj. U biološkim sustavima prilikom vezanja na makromolekule kadmij i cink reagiraju s donorima S-, O- i N- te se vežu s jednakim proteinima, albuminom u krvi i MT u raznim tkivima. Iako oba metala imaju visoki afinitet za vezanje na proteine i enzime koji sadrže sulfhidrilne skupine, kadmij ima veći afinitet za vezanje na S-ligande i N-donore u odnosu na cink zbog čega kadmij može zamijeniti cink u mnogim biološkim procesima (Brzóska i Moniuszko-Jakoniuk, 2001). Kako je već spomenuto naprijed, međudjelovanja kadmija i cinka su povezana s MT, koji može vezati najviše cinka od svih proteina u viših eukariota. Cink i kadmij potiču sintezu MT regulacijom transkripcijskog faktora MTF-1 (Martelli i sur., 2006). Kadmij jače potiče sintezu MT i ima veći afinitet za vezanje na MT od cinka (Klaasen i sur., 1999). Osim toga, vrijeme biološkog poluživota Cd-MT *in vivo* je dulje u odnosu na Zn-MT. Poticanjem sinteze MT kadmij može remetiti metabolizam cinka na crijevnoj i tkivnoj razini. Kadmij može uzrokovati oksidacijski stres u stanici vezanjem na mjesta vezanja cinka ili bakra u antioksidacijskim metaloenzimima poput Cu/Zn SOD i/ili katalaze (CAT) što dovodi do inhibicije tih enzima i povećanog nastajanja reaktivnih kisikovih spojeva (*reactive oxygen species*, ROS) (Bhattacharyya i sur., 2000).

Na razini želučanocrijevne apsorpcije međudjelovanje kadmija i cinka nastaje zbog visokog afiniteta obaju metala za MT u crijevima što uključuje poticanje sinteze MT kao i natjecanje kadmija i cinka za vezanje na MT. Tako, s jedne strane, kadmij ometa apsorpciju cinka, a s druge strane, cink unesen hranom utječe na apsorpciju kadmija. Istraživanja na pokusnim štakorima su pokazala da suplementacija cinkom u hrani u uvjetima peroralne izloženosti kadmiju povećava koncentraciju MT u crijevima i da je zbog vezanja kadmija na MT smanjen prijenos kadmija iz crijeva do jetre. Zamjenjujući cink, kadmij remeti apsorpciju, razdiobu i prijenos cinka do stanica i može inhibirati njegove fiziološke uloge na

brojnim razinama što može imati ozbiljne posljedice za zdravlje (Ohta i Cherian, 1991; Brzóska i Moniuszko-Jakoniuk, 2001).

Mehanizam međudjelovanja kadmija i cinka u posteljici nije do kraja razjašnjen, ali nekoliko istraživanja upućuje na mogućnost da nakupljanje kadmija u posteljici potiče sintezu MT koji bi mogao utjecati na povećano zadržavanje ne samo kadmija već i cinka u posteljici čime se remeti prijenos cinka do fetusa (Goyer, 1995; Torreblanca i sur., 1992; Ronco i sur., 2006; Sorkun i sur., 2007). Istraživanja provedena na posteljicama žena koje su pušile tijekom trudnoće pokazuju povećane količine kadmija, MT i cinka u tkivu posteljice (Kippler i sur., 2010; Stasenko i sur., 2010). S obzirom na to da nije uočena povezanost između cinka i MT kao ni kadmija i cinka u posteljici, Kippler i suradnici (2010) su pretpostavili da povećana ekspresija MT nije razlogom smanjenog prijenosa cinka do fetusa. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se rasvijetlilo međudjelovanje kadmija i cinka u posteljici, jer se najveći dio kadmija zadržava u posteljičnom tkivu dok cink i drugi nutrijenti prolaze do fetusa i u uvjetima izloženosti buduće majke kadmiju.

### 1.4.3. Bakar, željezo i kadmij

Bakar je esencijalan mikronutrijent i ključan dio brojnih enzima preko kojih sudjeluje u biološkim procesima uključujući stanično disanje preko citokrom C oksidaze, antioksidacijsku obranu preko Cu/Zn SOD, stvaranje vezivnog tkiva preko lizil oksidaze i povezanih proteina, biosintezu neurotransmitera dopamin beta hidroksilaze, dozrijevanje peptidnih hormona peptidnim  $\alpha$ -amidirajućim enzimom, pigmentaciju tirozinazom, povezivanje keratina sulfhidril oksidazom te homeostazu željeza ceruloplazminom i hefestinom (WHO, 1998; ATSDR, 2004). Bakar može biti uključen i u procese mijelinizacije, reguliranje cirkadijurnog ritma, koagulacije, angiogeneze i metabolizma sfingolipida (u: Ellingsen i sur., 2007). Metabolizam bakra se mijenja tijekom upalnih procesa, infekcija i malignih stanja i bolesti. Tijekom upale i infekcija razine bakra i ceruloplazmina u serumu porastu, a razine ceruloplazmina pozitivno koreliraju sa stupnjem razvoja malignoma. Bakar je ključan i za uspješne imunosne odgovore (u: Arredondo i Núñez, 2005).

Preporučeni unos bakra u odraslog čovjeka iznosi 0,9 mg na dan ili 0,013 mg Cu/kg tjelesne mase na dan što se tijekom trudnoće povećava na 1,0 mg i tijekom dojenja na 1,3 mg na dan. Većina bakra se unosi u organizam prehranom i njegov unos ovisi o prehranbenim navikama i količini u hrani koja se konzumira. Vodom za piće se unosi 6 do 13% bakra, no može znatno pridonijeti svakodnevnom unosu bakra ako su upotrijebljene bakrene cijevi (Gaetke i Chow, 2003). Jestive iznutrice (jetra i bubrezi) sadrže najviše razine bakra, a ostali izvori bakra u hrani jesu ribe, voće, žitarice, orašasti plodovi i zeleno povrće (pr. grašak). Nešto niže razine bakra se nalaze u mesu dok mliječni proizvodi i mlijeko sadrže niske količine bakra (ATSDR, 2004).

Količine bakra u organizmu su rezultat ravnoteže između apsorpcije i izlučivanja bakra (Linder i Hazegh-Azam, 1996). Apsorpcija bakra u organizmu ovisi o brojnim čimbenicima uključujući unesene količine, kemijski oblik bakra i prisutnosti drugih elemenata u prehrani kao što je cink. Istraživanja na pokusnim životinjama su pokazala da visoki peroralni unos cinka može potaknuti sintezu MT u crijevima. Zbog većeg afiniteta za MT od cinka, bakar će se vezati za MT u enterocitima nakon čega dolazi do odumiranja stanica i izlučivanja bakra stolicom. Takav mehanizam međudjelovanja bakra i cinka je nađen samo pri unosu veoma velikih količina cinka (u: Ellingsen i sur., 2007). Proteini životinjskog podrijetla, aminokiseline, fitati, vlakna, askorbinska kiselina i ugljikohidrati također utječu na želučanocrijevnu apsorpciju bakra (WHO, 1998). Oko 30 do 50% bakra unesenog prehranom u sisavaca apsorbira se u tankom crijevu dok se mala količina apsorbira već u želucu.

Još uvijek nisu do kraja razjašnjeni mehanizmi apsorpcije bakra u enterocite pomoću prijenosnika za bakar Ctr1 i DMT1 (Gaetke i Chow, 2003; Ellingsen i sur., 2007). U istraživanju na ljudskim stanicama raka debelog crijeva Caco-2 je pokazano da bakar inhibira unos željeza i obrnuto (Arredondo i sur., 2003). Nakon što se zadovolje nutritivne potrebe za bakrom, nagomilavanje bakra se može spriječiti pomoću nekoliko mehanizama. Višak bakra apsorbiran u stanicama želučanocrijevnog sustava inducira sintezu i veže se na MT. Nakon odumiranja stanica, bakar vezan za MT u crijevima se prenosi u jetru, otpušta u žuč, prenosi u crijeva i izlučuje stolicom. U normalnim fiziološkim uvjetima oko 98% bakra se izlučuje stolicom, a ostalih 2% mokraćom. U slučajevima kada je reapsorpcija u bubrežnim kanalićima poremećena, kao što je slučaj u Wilsonovoj bolesti, bubrežna filtracija ima važniju ulogu u izlučivanju bakra od prije opisane (Linder i Hazegh-Azam, 1996; ATSDR, 2004; Ellingsen i sur., 2007). Bakar je prisutan u svim organima odraslih osoba najviše u jetri (3 do 10 µg/g), mozgu (4 do 6 µg/g), srcu (3 do 4 µg/g) i bubregu (1,5 do 4,7 µg/g). Količine bakra u jetri novorođenčadi su najviše nedugo nakon rođenja i više 5 do 10 puta nego u odraslih osoba. Posebno visoke količine bakra u jetri nađene su u osoba s kroničnim jetrenim bolestima. U posteljici su nađene količine bakra oko 5 µg /g svježe mase tkiva (u: Ellingsen i sur., 2007).

Nedostatak bakra u organizmu odraslih je rijedak, ali su brojni slučajevi nedostatka bakra uočeni u dojenčadi i djece. Kao sastojak ceruloplazmina, bakar sudjeluje u oksidaciji fero u feri oblik željeza prije njegovog vezanja na transferin. Odsutnost ceruloplazmina nema ozbiljne posljedice na metabolizam bakra, ali dovodi do štetnog nagomilavanja željeza u jetri i drugim parenhimnim organima. Može doći i do razvoja mikrocitne hipokromne anemije jednako kao i pri nedostatku željeza. Refrakтерна anemija je u zdravih osoba inače najčešća posljedica nedostatka bakra i povezana je s fero-oksidadnom aktivnošću ceruloplazmina u makrofazima retikuloendotelnog sustava. Do anemije uzrokovane nedostatkom bakra može doći i u slučaju dugotrajnog liječenja preparatima koji sadrže cink zbog međudjelovanja svih triju tri mikronutrijenta, bakra, cinka i željeza (u: Ellingsen i sur., 2007). Osim navedenih, moguće posljedice nedostatka bakra u organizmu su i poremećaji u kostima nađeni u male djece rođene s niskom porođajnom masom, povećane mogućnosti za razvoj infekcija, povećane koncentracije kolesterola i proteina male molekulske mase, promijenjen srčani ritam, zastoj u rastu djece i hipopigmentacija kose (WHO, 1998).

Opisane moguće štetne posljedice pokazuju da je metabolizam bakra usko povezan s metabolizmom željeza. Bakar je ključan za apsorpciju i iskoristivost željeza te za nastajanje hemoglobina čime sprječava pomanjkanje željeza i nekoliko vrsta anemija. U posljednjem

koraku u biosintetskom putu hema u citosolu eritroblasta, željezo se prenosi do mitohondrija, gdje se ugrađuje u protoporfirin iz kojega nastaje hem. Ta reakcija je katalizirana hem sintetazom u mitohondriju kojoj je supstrat oksidirani feri oblik vezan za transferin, pri čemu je potreban enzim citokrom c oksidaza koja sadrži bakar i donira elektrone izravno na feri željezo. U mitohondrijima koji ne sadrže citokrom c oksidazu je smanjena sinteza hema. Osim nedostatka citokrom c oksidaze, nedostatak ceruloplazmina također može utjecati na metabolizam željeza u smislu smanjenog prijenosa željeza od retikuloendotelih stanica do transferina te od stanica parenhima jetre do transferina. Istraživanja provedena na pokusnim životinjama koje su imale nedovoljne količine bakra su pokazala da niske vrijednosti krvnih pokazatelja mogu biti uzrokovane nedostatkom ceruloplazmina i citokrom c oksidaze. Osim nedostatka bakra, i višak bakra može poremetiti metabolizam željeza, ali u manjoj mjeri (Williams i sur., 1976; Ramirez-Cárdenas i sur., 2005).

Povezanost metabolizma bakra i željeza je također veoma važna tijekom graviditeta. Andersen i suradnici (2007) su pokazali da je prehrana osiromašena bakrom u pokusnih skotnih štakorica utjecala na količine željeza u majčinoj jetri i fetusu kao i na povećanu ekspresiju prijenosnika željeza, Tf receptora i DMT1, dok je ekspresija FPN1 bila nepromijenjena. Nije bilo učinka na ekspresiju mRNA prijenosnika za bakar u posteljici štakorica hranjenih hranom s nedovoljnom količinom bakra. Ti su nalazi u sukladnosti s rezultatima prijašnjeg istraživanja iste skupine autora u kojem je nedostatak željeza u prehrani majke na jednaki način utjecao na ekspresiju prijenosnika željeza (Gambling i sur., 2001).

Nedostatak bakra može štetno utjecati na ishod trudnoće, razvoj fetusa i na rast i zdravlje novorođenog djeteta. Posljedice nedostatka bakra u trudnoći ovise o stupnju njegove deficijencije. Veliki nedostatak bakra u trudnoći može dovesti do rane smrti embrija i teških oblika malformacije fetusa, dok manji nedostatak bakra može ugroziti preživljavanje novorođenčadi odnosno utjecati na porođajnu masu. Nedostatak bakra u prenatalnom razdoblju može uzrokovati malformacije ploda, poremećaje u funkcijama pluća i neurokemijskim procesima te smanjene razine noradrenalina i porast razina dopamina u određenim područjima mozga. Istraživanja na pokusnim glodavcima su također pokazala da nedostatak bakra u ranom postnatalnom razdoblju može uzrokovati poremećaje u razvoju uključujući strukturne promjene srca i imunosne poremećaje u domaćih i laboratorijskih životinja. Nedostatak bakra u postnatalnom razdoblju može uzrokovati nedostatak željeza i utjecati na funkcije štitnjače što može dovesti do funkcionalnih ispada senzomotornih aktivnosti. Osim kratkotrajnih posljedica na ishod graviditeta, u pokusnih životinja postoje dokazi i o dugotrajnim posljedicama nedostatka bakra koji uključuju poremećaje motorike i

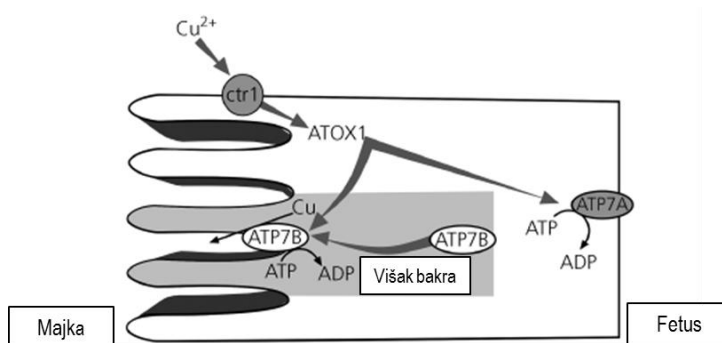
ponašanja. Poremećaji u razvoju embrija, fetusa i djeteta nakon rođenja nastaju kao izravna posljedica nedostatka bakra tijekom razvoja ploda *in utero* (u: Gambling i sur., 2011).

Izloženost povišenim razinama bakra može štetno utjecati na zdravlje i uzrokovati oštećenja jetre i bubrega, smanjenu razinu željeza, imunotoksičnost i imati štetne posljedice na rast i razvoj. Većina tih učinaka nastaje zbog oksidacijskog oštećenja staničnih membrana i makromolekula u kojima se bakar može vezati na sulfhidrilne skupine u nekoliko enzima, uključujući glukoza-6-fosfatazu i glutation reduktazu. Na taj se način može ometati zaštita stanica od oštećenja slobodnim radikalima. Najčešće posljedice štetnih učinaka bakra na zdravlje jesu želučanocrijevni znakovi mučnina, povraćanje i/ili bol u trbuhu, koji se javljaju ubrzo nakon konzumiranja veće količine bakra iz otopine bakrenog sulfata, iz pića koja su čuvana u limenkama koje sadrže bakar ili vodom koja je odstajala u bakrenim cijevima. Ti poremećaji ne traju dugo i nisu povezani s ostalim učincima na zdravlje. Istraživanja na pokusnim životinjama su također pokazala želučanocrijevne poremećaje nakon konzumiranja bakrenog sulfata krmivom, a može doći i do iritacija sluznica dišnog sustava (ATSDR, 2004).

Rijetki genetski poremećaji metabolizma bakra u ljudi jesu Wilsonova i Menkesova bolest. U osoba koje imaju Wilsonovu bolest je smanjeno izlučivanje bakra u žuči što ima za posljedicu nagomilavanje bakra u jetri, bubrezima i mozgu. Do te bolesti dolazi zbog mutacije na ATP7B genu čija je najveća ekspresija nađena u jetri i bubrezima i nešto manja u plućima i posteljici. Gen ATP7B je također uključen u stvaranje proteina koji regulira normalan cirkadijurni ritam, pa zbog toga ti bolesnici mogu imati i smetnje spavanja. U osoba oboljelih od Menkesove bolesti postoji deficijencija bakra u organizmu. Radi se o genetskom poremećaju u metabolizmu bakra s poteškoćama u apsorpciji bakra unesenog hranom i ozbiljnim poremećajima u međustaničnom prijenosu bakra. Javlja se u djece muškog spola zbog poremećaja na X kromosomu s mutacijom na genu ATP7A, čija ekspresija je nađena u svim tkivima i organima osim u jetri. Bakar se ne može prenijeti do važnih enzima što rezultira fenotipom s nedostatkom bakra, pa djeca rođena s tim poremećajem umiru prije treće godine života. Karakteristična su progresivna neurološka oštećenja, poremećaji u vezivnom tkivu i neobično kruta kosa. Dolazi do nakupljanja bakra u tkivima, osim u jetri i mozgu, što potiče nastajanje velikih količina MT (DiDonato i Sarkar, 2000; Ellingsen i sur., 2007).

Mehanizmi prijenosa bakra kroz posteljicu nisu do kraja razjašnjeni, a dosadašnja saznanja su shematski prikazana na slici 2 (McArdle i sur., 2008). Poznato je da bakar iz majčinog krvotoka ulazi u posteljicu nakon vezanja na prijenosnik za bakar Ctr1. Dokazana je ekspresija Ctr1 prijenosnika u posteljici kao i da je taj prijenosnik nužan za rast i razvoj embrija (Lee i sur., 2001). Pretpostavlja se da se nakon ulaska u posteljicu bakar prenosi na

sličan način kao i u drugim tkivima i veže na prateći protein (*chaperon*), vjerojatno ATOX1, koji ga prenosi do jedne od dvije bakrove ATP-aze čija je ekspresija nađena u posteljici. Nakon vezanja na ATP7A, poznatom i pod nazivom Menkesov protein, ili ATP7B, Wilsonov protein, bakar prolazi kroz stanične membrane trofoblasta i ulazi u krvotok fetusa na način koji još uvijek nije poznat (McArdle i sur., 2008).



**Slika 2.** Shematski prikaz prijenosa bakra kroz ljudsku i štakorsku posteljicu (preuzeto iz: McArdle i sur., 2008)

Hardman i suradnici (2004) su istraživali ekspresiju i lokalizaciju ATP7A i ATP7B u ljudskoj posteljici i pokazali su da se ATP7A nalazi u različitim stanicama, dok je ATP7B nađen samo u sinciciotrofoblastu. Razine tih proteina se ne mijenjaju tijekom trudnoće, pa se povećani unos bakra pri kraju graviditeta može povezati s promjenom njihove lokacije u posteljici. U istraživanjima na stanicama trofoblasta, isti autori su pokazali da se ATP7A nalazi na bazolateralnoj membrani i da prenosi bakar iz posteljice do fetusa, dok u slučaju viška ATP7B prenosi bakar natrag u majčin krvotok (Hardman i sur., 2007).

Metali kadmij, cink i bakar su povezani različitim međudjelovanjima koja su sva povezana s MT (Carmichael i sur., 1982). To je detaljno opisano u povezanosti s rezultatima ovog istraživanja u dijelu Rasprava.

## 1.5. Stvaranje spolnih hormona u steroidogenim organima i kadmijs

### 1.5.1. Razvoj i struktura posteljice

Posteljica je privremeni organ u sisavaca (plodvaša ili *Placentalia*), uključujući ljude. Ima brojne funkcije koje se mijenjaju tijekom graviditeta i čine poveznicu između majke i fetusa s kojima tvori jedinstvenu maternalno-posteljično-fetalnu funkcionalnu jedinicu. Nakon oplodnje i nastanka blastociste dolazi do razvoja posteljice na mjestu implantacije blastociste u sluznicu maternice (endometrij). Posteljica se razvija na mjestu razgraničenja trofoblasta (vanjskog sloja stanica u blastocisti) kao embrionalno-fetalnog dijela i sluznice maternice kao majčinog dijela, koji se zove decidua i odljušti nakon porođaja. Trofoblast poslije tijekom razvoja posteljice zamijeni vanjska embrionalna ovojnica tzv. korion, koja predstavlja fetalnu stranu posteljice i koja je u neposrednom dodiru s maternicom. U ljudi se implantacija i nastanak posteljice u najčešćoj jednoplodnoj trudnoći događaju na jednom mjestu u maternici, a u glodavaca u dva roga maternice. Posteljice ljudi i glodavaca (pokusnih štakora) su korioalantoisnog tipa zbog opskrbe koriona krvlju iz krvnih žila alantoisa. U ljudi je posteljica potpuno razvijena između 10. i 13. tjedna trudnoće, a u štakora i miševa do 12. dana skotnosti (Duančić, 1972; Furukawa i sur., 2011). Funkcije posteljice prije njezinog stvaranja u štakora obavlja žumanjčana vreća. Posteljica štakora je, slično kao i u ljudi, hemokorijalnog tipa što znači da su stanice trofoblasta u izravnom dodiru s majčinom krvlju. Sustav fetalnih i majčinih krvnih prostora (lakuna) oblikuje dva odvojena krvotoka razdvojena posteljičnom membranom (trofoblastom). Prema broju slojeva trofoblasta hemokorijalne posteljice mogu biti hemomonokorijalne (u ljudi), hemodikorijalne i hemotrikorijalne (u štakora i miševa). U štakora je vanjski sloj trofoblasta uronjen izravno u majčin optok krvi dok su unutarnja dva sloja sincicijska. U hemomonokorijalnim posteljicama, kao što je ljudska, korionske se resice tijekom prvog tromjesečja sastoje od unutarnjeg sloja (citotrofoblasta) i površinskog sloja (sinciotrofoblasta ili sincicija). Kako trudnoća napreduje, nestaje unutarnji sloj, a površinski sloj postepeno gubi funkciju i prelazi u homogenu masu i zbog toga se takva posteljica naziva hemomonokorijalnom posteljicom (Furukawa i sur., 2011; Šerman i Šerman, 2011).

Štakorska posteljica ima oblik diska i može se podijeliti na fetalni i majčinski dio. Fetalni dio posteljice se sastoji od zone labirinta i bazalne zone. U zoni labirinta su krvi majke i fetusa blizu i na tom sučelju se odvija maternalno-fetalna razmjena svih hranjivih i otpadnih tvari. Kako skotnost napreduje, zona labirinta zauzima sve veći dio posteljice. U bazalnoj zoni se nalaze kanalići koji odvođuju majčinu krv iz posteljice i u toj zoni fetalne kapilare nisu



prisutne. Majčin dio posteljice se sastoji od decidue i endometrija. Decidua je epitelni dio maternice ili endometrija u koji se ugnijezdila blastocista. Može stvarati različite hormone, citokine, hormon rasta i imunomodulatorne molekule uključene u pronalaženje specifičnih imunskih stanica i rast posteljice. Fetalne membrane koje okružuju fetus štakora su amnion i žumanjčana vreća. Amnion je unutrašnja membrana ispunjena amnionskom tekućinom unutar koje se nalazi i pluta fetus tijekom kasne skotnosti i koja štiti fetus od ozljeda. Žumanjčana vreća štakora se sastoji od dva dijela, visceralne žumanjčane vreće koja okružuje embrio s amnionom i parijetalne žumanjčane vreće nasuprot koriona. Sredinom skotnosti parijetalna žumanjčana vreća puca, a visceralna žumanjčana vreća ostaje izložena unutrašnjosti maternice i naziva se reverznom žumanjčanom vrećom (u: Furukawa i sur., 2011).

Zbog određenih sličnosti u građi ljudske i štakorske posteljice kao i fazama ranog razvoja posteljice, štakorska posteljica može poslužiti kao koristan model u istraživanjima razvojne i reproduktivne toksičnosti kemijskih tvari i lijekova (Beck, 1981; de Rijk i sur., 2002; Furukawa i sur., 2011; Šerman i Šerman, 2011). Pri tome se trebaju imati na umu ove razlike između ljudske i štakorske posteljice: 1) omjer embrionalnog/fetalnog razdoblja je u štakora 3/1, a u ljudi 1/4; 2) vrsta implantacije je u štakora ekscentrična, a u ljudi intersticijska; 3) uloga žumanjčane vreće koja u štakora obavlja posebne funkcije tijekom cijele skotnosti, dok u ljudi predstavlja privremeni organ važan tijekom organogeneze i nestaje koncem prvog tromjesečja trudnoće; 4) struktura posteljice i sinteza steroidnih hormona (Furukawa i sur., 2011).

### 1.5.2. Steroidogeneza u ljudi i štakora tijekom trudnoće odnosno skotnosti

Između brojnih važnih funkcija koje ima tijekom graviditeta posteljica je aktivan steroidogeni organ koji održava razinu steroidnih hormona nužnih za održavanje trudnoće, razvoj fetusa i ročni porođaj zdravog novorođenčeta (Solomon, 1988; Piasek i sur., 2007; Miller i Auchus, 2011). U ljudskom posteljičnom sinciotrofoblastu odvijaju se sinteza progesterona iz kolesterola preko pregnenolona i sinteza estrogena nakon pretvorbe androgena (muških spolnih hormona) u nadbubrežnoj žlijezdi fetusa. Sintaza progesterona u ljudskoj posteljici započinje nakon tzv. lutealno-placentalnog pomaka između sedmog i devetog tjedna trudnoće do porođaja i u tom se razdoblju ne odvija sinteza progesterona u žutom tijelu jajnika. Razina potrebnog progesterona tijekom trudnoće se održava jedino i isključivo njegovim stvaranjem u posteljici. Progesteron je nužan tijekom trudnoće u pripremi maternice za implantaciju, sprječavanju kontrakcija maternice do porođaja i općenito ima ulogu u održavanje trudnoće do porođaja u roku. Sintaza progesterona u posteljici jednako kao i u jajnicima izvan trudnoće ovisi o dostupnosti lipoproteina niske gustoće (LDL) iz krvotoka majke i međustaničnoj hidrolizi kolesterol estera u slobodni kolesterol. U sinciotrofoblastu se jednako kao i u jajnicima izvan trudnoće i u nadbubrežnoj žlijezdi kolesterol pretvara u pregnenolon pomoću enzima iz obitelji citokroma koji odcjepljuje bočni lanac u kolesterolu tzv. CYP11A (ili P450<sub>scc</sub> prema starom nazivlju). Nakon sinteze pregnenolona može doći do pretvorbe pregnenolona u progesteron pomoću enzima 3 $\beta$ -hidroksisteroidne dehidrogenaze (3 $\beta$ HSD) u posteljici ili do 17 $\alpha$ -hidroksilacije pregnenolona u 17 $\alpha$ -hidroksipregnenolon pomoću enzima 17 $\alpha$ -hidroksilaze/17,20-liaze (CYP17 ili P450<sub>c17</sub>) u nadbubrežnoj žlijezdi fetusa. U fetalnoj nadbubrežnoj žlijezdi se 17 $\alpha$ -hidroksipregnenolon pretvara u dehidroepiandrosteron (DHEA) pomoću CYP17 enzima i u fetalnoj jetri dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS). U posteljici djelovanjem steroidnih sulfataza, enzima 3 $\beta$ HSD, 17HSD i CYP19 (P450<sub>aromataze</sub>) iz DHEA kao supstrata nastaje estradiol. Na taj su način u steroidogenezi, naročito u stvaranju estrogena u posteljici tijekom trudnoće, uključena sva tri segmenta funkcionalne maternalno-placentarno-fetalne jedinice. Tijekom steroidogeneze u trudnoći, zbog nedostatka CYP17 enzima u posteljici, dio pretvorbe do DHEA se događa u fetusu. To međutim nije slučaj u posteljici štakora gdje je nađena ekspresija CYP17 enzima i zato se u njoj stvaraju i progesteron, i testosteron (Payne i Hales, 2004; Goodman, 2009; Sanderson, 2009; Miller i Auchus, 2011).

Još je nekoliko razlika u steroidogenezi tijekom graviditeta u žena i štakorica. Dok je u ljudskoj posteljici ekspresija enzima CYP11A nađena u stanicama sinciotrofoblasta, u

posteljici štakorica je CYP11A enzim izražen u gigantskim stanicama trofoblasta sredinom skotnosti. Tijekom trudnoće glavno mjesto ekspresije CYP19 enzima je posteljica pa se zato u njoj stvaraju estrogene, dok u posteljici štakora nije nađena ekspresija tog enzima tijekom skotnosti i on postoji u žutim tijelima jajnika štakorice u kojima se zbog toga sinteza estrogena odvija tijekom cijelog trajanja skotnosti. U prvom dijelu skotnosti, steroidogeneza u žutim tijelima je stimulirana prolaktinom i luteinizirajućim hormonom (LH) koje izlučuje hipofiza, a estradiol se sintetizira iz androgenog prekursora koji nastaje u jajnicima. Sredinom skotnosti, zbog smanjenja aktivnosti prolaktina i LH štakorska posteljica počinje sintetizirati androgene koji su supstrati/prekursori za povećanu sintezu estradiola u jajnicima. Zbog toga su u štakorica za razliku od žena tijekom skotnosti, uz posteljicu, u sintezu progesterona i estradiola uključeni i žuta tijela u jajnicima i hipofiza (Payne i Hales, 2004).

U štakorica tijekom skotnosti posteljica i jajnici stvaraju testosteron koji ima važnu ulogu u održavanju funkcije žutih tijela u drugom dijelu skotnosti. Tada dolazi do pomaka pri čemu iz pregnenolona, umjesto progesterona, nastaje androgen koji postaje glavni supstrat sinteze estrogena u jajnicima. Iako je od 12. do 16. dana skotnosti pokazana 2 do 4 puta veća sinteza androstendiona u odnosu na testosteron, sinteza testosterona u zadnjem dijelu skotnosti raste u odnosu na androstendion i najveća je 18. dana skotnosti (3 do 5 dana prije okoćenja). U drugom dijelu skotnosti u žutim tijelima jajnika dolazi do sinteze estrogena iz posteljičnih androgena (androstendiona i testosterona) koji imaju važnu ulogu u održavanju funkcije jajnika u tom razdoblju skotnosti. Iako nisu sasvim poznati mehanizmi regulacije sinteze testosterona u posteljici, a istraživanja su pokazala da to nije ovisno o hipofizi i broju posteljica, za sintezu testosterona u jajnicima je dokazana važna uloga posteljice koja osigurava supstrat – androgene za sintezu estrogena u žutim tijelima jajnika (Matt i Macdonald, 1984; Jackson i Albrecht, 1985; Sridaran i Gibori, 1987).

### 1.5.3. Učinci kadmija na sintezu steroidnih hormona u posteljici i spolnim žlijezdama

Učinci kadmija na steroidogene organe, gonade i posteljicu, uvelike ovise o biološkoj vrsti i soju, dobi, spolu, fiziološkom i patološkom stanju te razini izloženosti i vrsti prehrane (Piasek i Laskey, 1994; Henson i Chedrese, 2004; Chedrese i sur., 2006; Iavicoli, 2009; Henson i sur., 2010).

Zbog važnosti i održavanja optimalnih razina steroidnih hormona u posteljici, bilo kakve promjene u njihovoj biosintezi mogu imati štetne učinke na sveukupnu steroidogenezu koja se tijekom skotnosti štakorice odvija u posteljici i žutim tijelima jajnika. Istraživanja koja su započela devedesetih godina prošloga stoljeća o steroidogenezi u ljudima te su nadopunjavana istraživanjima *in vivo* i *in vitro* na ljudima i pokusnim modelima životinja, uključujući štakore, su pokazala da kadmij može djelovati i kao kemijska tvar sa svojstvima izazivanja endokrine disrupcije (ED) ženske reprodukcije. U svojim djelovanjima, kemijske tvari sa svojstvima ED, mogu međudjelovati pri, u pravilu, niskim razinama izloženosti, s endogeno stvorenim hormonima i tako oponašati (imitirati), pojačavati i/ili inhibirati djelovanja hormona u tijelu te imati štetne učinke na reproduktivne i druge funkcije u brojnim životinjskim vrstama, uključujući sisavce i ljude. Zbog toga se metali, uključujući i kadmij, koji imaju svojstva endokrinih disruptora često nazivaju ksenoestrogenima, metaloestrogenima ili okolišnim estrogenima odnosno općenito metalnim endokrinim disruptorima (Johnson i sur., 2003; Henson i sur., 2010).

Učinci kadmija na smanjeno stvaranje progesterona u posteljičnom trofoblastu su pokazani u ljudskoj posteljici u istraživanjima *ex vivo* (Piasek i sur., 2001; 2007) i *in vitro* (Jolibois i sur., 1999a). Istraživanja *in vitro* su pokazala da dolazi do inhibicije sinteze progesterona ovisno o trajanju i primijenjenoj dozi kadmija u kulturama sinciciotrofoblasta pri čemu se ne remeti nastanak posteljičnog funkcionalno aktivnog tkiva sinciciotrofoblasta iz citotrofoblasta, u kojemu se odvija sinteza progesterona (Henson i Chedrese, 2004; Piasek i sur., 2007). Mehanistička istraživanja na ljudskim posteljicama *in vitro* su pokazala da kadmij inhibira produkciju progesterona djelovanjima na nekoliko mjesta: na LDL receptore membrane steroidogene stanice i na enzime CYP11A (P450<sub>scc</sub>) i 3βHSD koji sudjeluju u sintezi progesterona (Jolibois i sur., 1999a; 1999b; Kawai i sur., 2002). Slično su rezultati istraživanja provedenih na štakoricama Sprague-Dawley pokazali snižene količine progesterona u posteljicama štakorica koje su bile izložene kadmiju parenteralno (u potkožno postavljenim pumpicama u dozi od 5 mg kadmija/kg tjelesne mase od 1. do 19. dana skotnosti) i koje su istodobno bile hranjene krmivom sa smanjenim željezom. Pri tome nije

bilo vidljivih morfoloških promjena u posteljičnom tkivu što znači da su promjene u funkciji nastale prije štetnih učinaka na funkcionalno aktivne strukture steroidogenog organa - posteljice (Piasek i sur., 2000; 2002).

Podaci iz literature upućuju da bi se izloženost majke kadmiju mogla povezati s reproduktivnim razvojem i štetnim učincima kadmija na buduću plodnost potomaka. U istraživanju na štakorima koji su bili peroralno izlagani subteratogenoj dozi kadmija (20 mg/kg/dan) za vrijeme intenzivne organogeneze (od 6. do 14. dana skotnosti) uočene su malformacije kostura i organa fetusa. U ženskih je potomaka nakon okoćenja primijećeno kašnjenje u otvaranju rodnice. Izloženost majke kadmiju imala je učinke i na promjene u spolnom ponašanju potomaka obaju spolova što su autori povezali s mogućim učincima kadmija na hipotalamsko-hipofizno-gonadalnu funkcionalnu os, odnosno s mogućim djelovanjem kadmija kao endokrinog disruptora (Salvatori i sur., 2004). U istraživanju koje su poslije toga proveli Couto-Moraes i suradnici (2010), peroralna izloženost štakorica kadmiju je bila niža ili jednaka (10 ili 20 mg/kg/dan) u kasnoj skotnosti (od 18. do 21. dana skotnosti) i do 7. dana dojenja što je uzrokovalo smanjenje duljine i težine tek okoćene mladunčadi. U daljnjem tijeku postnatalnog života mladunčadi je nađen smanjeni anogenitalni razmak te zakašnjeli razvoj tijela i refleksa u mladunaca izloženih višoj dozi kadmija preko majke. Primjena testosterona odmah nakon okoćenja nije utjecala na zakašnjelo spuštanje testisa i poremećaje anogenitalnog razmaka. Autori su objasnili utjecaj izloženosti majke kadmiju na pokazatelje spolnog razvoja u muških potomaka učincima na maskulinizaciju koja je regulirana iz hipotalamusa. U nastavku istraživanja su našli promjene u spolnom ponašanju muških potomaka perinatalno izloženih kadmiju pri jednakim dozama izloženosti kada je postnatalna primjena testosterona djelomice ublažila te učinke kadmija (Couto-Moraes i sur., 2012).

Ji i suradnici (2011) su procjenjivali učinke izloženosti kadmiju u pokusnih mišica tijekom četiri dana u razdoblju kasne skotnosti (0,5 mg CdCl<sub>2</sub>/kg/dan intravenozno, od 13. do 17. dana skotnosti) na steroidogenezu muških potomaka. Našli su smanjene tjelesne mase fetusa, tjelesne duljine od glave do vrha repa i težine testisa. Također su nađene smanjene razine testosterona u serumu, smanjena ekspresija steroidogenog akutnog regulatornog proteina (StAR) i nekoliko ključnih enzima potrebnih za sintezu testosterona u testisima fetusa. U odraslim potomcima majki koje su bile izložene kadmiju su razine testosterona u serumu i testisima te ekspresija enzima CYP11A (P450<sub>scc</sub>) u testisima bili smanjeni. Autori su zaključili da se zbog zadržavanja većine kadmija u posteljici i sprječavanja prijenosa

kadmija do fetusa, ireverzibilna oštećenja zbog izloženosti majke kadmiju tijekom skotnosti ne mogu pripisati izravnim učincima kadmija na testise fetusa.

Istraživanja u prošlosti su pokazala da akutno dane visoke doze kadmija (iznad 1 mg/kg tjelesne mase) mogu uzrokovati nekrozu testisa u odraslih pokusnih glodavaca iako se relativno mala količina kadmija nakuplja u testisima (Gun i Gould, 1970). Nakon izloženosti kadmiju u trajanju od nekoliko tjedana nađena je smanjena težina testisa koji je bio atrofičan i kalcificiran (Elinder, 1986). I u pokusnih štakorica su pri akutnim visokim dozama kadmija (1 do 6 mg/kg tjelesne mase) opisana reverzibilna vaskularna oštećenja jajnika s krvarenjima, degeneracijom folikula i nekrozom (u: Pařízek, 1983).

Novija istraživanja na pokusnim životinjama ili gonadama pokusnih životinja su pokazala da izloženost kadmiju može uzrokovati reproduktivne učinke pri nižim dozama izloženosti izazivanjem promjena u produkciji steroidnih hormona u jajniku i testisu i bez izazivanja njihovih morfoloških promjena (Laskey i sur., 1984; Piasek i Laskey, 1994; Piasek i sur., 1999; 2002; Chedrese i sur., 2006, Takiguchi i Yoshihara, 2006). Pokazano je da izloženost niskim dozama kadmija ne uzrokuje atrofiju testisa ali može poremetiti steroidogenezu u smislu smanjene razine testosterona u serumu (Laskey i sur., 1984). Mehanizmi djelovanja kadmija na sintezu testosterona nisu još ni do danas do kraja razjašnjeni. Istraživanje Zenga i suradnika (2003) je pokazalo da kadmij može različito djelovati na produkciju testosterona ovisno o putu unosa u organizam. Kronična peroralna izloženost kadmiju uzrokovala je povišene razine testosterona u serumu pa su autori pretpostavili da se mehanizmi djelovanja kadmija na sintezu testosterona u ovom slučaju razlikuju u odnosu na mehanizme prilikom parenteralnog (potkožnog ili intraperitonealnog) izlaganja kadmiju. Utjecaj soja na otpornost testisa na učinke kadmija je pokazan u istraživanju na pokusnim miševima gdje je divlji soj bio osjetljiv dok su mutirani sojevi bili otporni na štetne učinke kadmija (Taylor i sur., 1973).

Učinci kadmija na steroidogenezu u jajnicima *in vivo* su nađeni u različitim fazama estrusnog ciklusa štakorica nakon jednokratnog potkožnog ubrizgavanja kadmija (u dozi od 3 ili 5 mg/kg tjelesne mase) na dan diestrusa ili 7. odnosno 16. dan skotnosti. Opaženi su učinci na više mjesta u biosintetskom putu steroidnih hormona u jajniku sa smanjenim produkcijama testosterona i estradiola u proestrusu i 8. dana skotnosti, dok je 17. dana skotnosti bila povećana produkcija progesterona (Piasek i Laskey, 1994). Neposredan učinak kadmija na sintezu hormona u stanicama jajnika je nađen i *in vitro* pri čemu je kadmij najviše utjecao na sintezu progesterona i testosterona u fazi proestrusa, manje u ranoj skotnosti, a u kasnoj skotnosti nisu nađeni učinci na steroidogenezu. Pri rabljenim dozama *in vitro* nije bilo učinka

na sintezu estradiola u jajnicima (Piasek i Laskey, 1999). U istraživanju kojeg su proveli Zhang i suradnici (2008) je također pokazano da kadmij može inhibirati stvaranje progesterona i estradiola u jajniku štakorice u različitim fazama estrusnog ciklusa u uvjetima izlaganja *in vivo* i *in vitro*.

U kulturama granuloza stanica ljudskog jajnika su nađene morfološke promjene i promjene u sintezi progesterona nakon 48-satne izloženosti kadmiju *in vitro* (Paksy i sur., 1997). Najniža doza kadmija od 16  $\mu\text{M}$  koja je utjecala na smanjenu produkciju progesterona je bila oko 3,5 puta veća od razine kadmija izmjerene u jajniku pušačica. Inhibicija sinteze progesterona kadmijem nađena je i u kulturama granuloza stanica štakorskih jajnika (Paksy i sur., 1992; 1996).

Učinci kadmija na neuroendokrinu regulaciju su pokazani u istraživanjima na odraslim štakorima muškoga spola koja su proveli Lafuente i suradnici (2003) gdje je kadmij različito djelovao na hormone hipofize. Učinak kadmija na prolaktin i adrenokortikotropni hormon (ACTH) ovisio je o danoj dozi. Pri niskim dozama kadmija (5 mg/l u vodi za piće) razine prolaktina u plazmi su bile povećane, dok su više doze kadmija (25 i 50 mg/l) bile povezane sa sniženjem razina prolaktina. Razine ACTH u plazmi su bile povećane pri dozama od 5 do 50 mg Cd/l, dok su pri najvećoj dozi od 100 mg Cd/l bile nepromjenjive. Učinci kadmija na hormon rasta, tireotropni hormon (TSH), folikulostimulirajući hormon (FSH) i LH nisu ovisili o dozi.

Dosadašnja istraživanja pokazuju da kadmij može djelovati različito na reprodukciju ovisno o razini izloženosti u ljudima i pokusnim životinjama. Iako je pokazano da kadmij najčešće inhibira sintezu progesterona u posteljici i jajnicima, nalazi istraživanja pokazuju da kadmij može i stimulirati steroidogenezu u jajnicima. Pokazno je da kadmij može utjecati na povećanje koncentracija progesterona u serumu štakora (Piasek i Laskey, 1994; Paksy i sur., 1996; Paksy i sur., 1997) i stimulirati sintezu progesterona u granuloza stanicama svinjskih jajnika (Massanyi i sur., 2000; Henson i Chedrese, 2004; Chedrese i sur., 2006) i zloćudnim stanicama trofoblasta (JAR stanicama koriokarcinoma) (Powlin i sur., 1997). Posebno su zanimljivi nalazi dobiveni u istraživanjima provedenima u kulturama granuloza stanica svinjskih jajnika koji su pokazali da postoji dvojak učinak kadmija na biosintezu steroidnih hormona u ovisnosti o razini izloženosti (dozi) kadmiju pri čemu su niže doze od 0,6 do 3  $\mu\text{mol}$  Cd stimulirale, a visoke doze od 5  $\mu\text{mol}$  Cd inhibirale ekspresiju gena enzima citokrom CYP11A (P450<sub>scc</sub>) i sintezu progesterona (Smida i sur., 2004; Henson i Chedrese, 2004; Chedrese i sur., 2006).

Istraživanja provedena u uvjetima *in vitro* i *in vivo* su pokazala da kadmij može djelovati i kao metaloestrogen u različitim tkivima (Henson i Chedrese, 2004; Chedrese i sur., 2006; Takiguchi i Yoshihara, 2006). Prvo istraživanje takve vrste su proveli Garcia-Morales i suradnici (1994) na ljudskim MCF-7 stanicama karcinoma dojki koji su pronašli da 1  $\mu$ mol kadmija oponaša učinke estrogena inhibirajući transkripciju gena za estrogenski receptor (ER) i smanjujući količine mRNA ER. Kadmij također oponaša učinke estrogena povećanjem aktivacije gena za progesteronski receptor (PR). Činjenice da se učinci kadmija na transkripciju i promjene u razinama mRNA i proteina estrogenskog i progesteronskog receptora mogu blokirati antiestrogenom (ICI-164384) te da drugi esencijalni metali (primjerice cink) nisu oponašali estrogeno djelovanje, potvrđuju učinke kadmija na transkripciju oponašanjem endogenog estrogena. Kadmij se čvrsto veže na domenu za vezanje hormona u ER $\alpha$ , sprječava vezanje estradiola i aktivira ER (Stoica i sur., 2000; Martin i sur., 2003). Istraživanja provedena na štakoricama su pokazala da je kadmij povećao težinu maternice i ubrzao rast i razvoj mliječnih žlijezda te potaknuo raniji početak puberteta (Johnson i sur., 2003). Martin i suradnici (2002) su pokazali u istraživanju na ljudskim stanicama raka prostate ovisnim o hormonima da kadmij oponaša djelovanje androgena i utječe na rast stanica i ekspresiju gena. Kadmij se može vezati na domenu za vezanje hormona na androgenom receptoru (AR) te inhibirati vezanje androgena na AR. Aktiviranje AR kadmijem se odvija sličnim mehanizmom kao i aktiviranje ER $\alpha$ .

Opisana istraživanja pokazuju da kadmij pod različitim uvjetima izloženosti može smanjivati ili povećavati razine endogeno stvorenih steroidnih hormona, progesterona i estrogena (u jajniku i posteljici) odnosno androgena (u testisima). Važno je istaknuti da ED reproduktivne funkcije u pravilu nastaje pri dozama (razinama izloženosti) pri kojima ne dolazi do morfoloških promjena reproduktivnih organa, pa ED, prema tome, ne slijedi klasično toksikološko pravilo doza-reakcija odnosno da „doza čini otrov“, već je potrebna sama prisutnost tvari koja može izazvati ED. U daljnjim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima tek treba istražiti uvjete i mehanizme pod kojima kadmij može djelovati kao ED ženske reprodukcije. Pogotovo je to sve velika nepoznanica što se tiče razina izloženosti kakve su prisutne u ljudskom okolišu. Daljnja opsežna istraživanja će pokazati razine i uvjete izloženosti pri kojima može doći do ED reprodukcije u žena izazvane kadmijem i/ili drugim kemijskim tvarima za koje su utvrđena takva svojstva u dosadašnjim istraživanjima *ex vivo*, *in vivo* i *in vitro*.



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

**Ciljevi** istraživanja ovog doktorskog rada su bili procijeniti učinke peroralne izloženosti kadmiju tijekom graviditeta, za što su podaci u literaturi manjkavi ili nedostaju:

- 1) **na razdiobu kadmija i stanje esencijalnih elemenata** željeza, cinka i bakra u tkivnim odjeljcima štakorica, krvi, jetri, bubregu i posteljici te u fetusu **usporedbom izloženih skotnih i neskotnih štakorica** iste dobi i pod jednakim uvjetima izloženosti;
- 2) **na funkcije posteljice** unutar maternalno-posteljično-fetalne funkcionalne jedinice
  - **u prijenosu kadmija i mikronutrijenata** željeza, cinka i bakra od majke do fetusa;
  - **u sintezi steroidnih hormona progesterona i testosterona** određivanjem njihovih količina u posteljičnom tkivu i koncentracija u serumu majke blizu roka okoćenja.

U općem stanovništvu hrana je najčešći izvor unosa nutrijenata ali i izloženosti toksičnim elementima, uključujući toksični metal kadmij. Apsorpcija kadmija u želučanocrijevnom sustavu sisavaca je relativno niska i u odraslih osoba iznosi 1 do 10%, dok je u pokusnih štakora 0,3 do 3%. Dosadašnjim istraživanjima u pokusnih mišica je dokazano da se tijekom skotnosti unos kadmija u crijevima povećava 2 do 3 puta zbog povećanih potreba ploda za nutrijentima (pr. kalcija, željeza, cinka, bakra i drugih) pri čemu se pojačano neselektivno apsorbira i toksičan metal kadmij. Tijekom graviditeta kadmij se nakuplja u posteljičnom tkivu gdje može remetiti funkcije posteljice u prijenosu esencijalnih elemenata do fetusa i sintezi hormona, uključujući steroidne hormone. To sve može imati štetne posljedice na održanje trudnoće, preživljavanje fetusa i perinatalni rast i razvoj potomka (Bhattacharyya i sur., 1991; WHO/EHC, 1992; Piasek i sur., 2007; ATSDR, 2012).

Učinci kadmija kao mogućeg disruptora ženske reproduktivne funkcije u sisavaca, uključujući disrupciju steroidogeneze se sve više istražuju (Henson i Chedrese, 2004; Chedrese i sur., 2006; Takiguchi i Yoshihara, 2006). Većina dosadašnjih istraživanja o učincima kadmija na steroidogenezu u žena odnosno u ženki pokusnih glodavaca *in vivo* je provedena u uvjetima akutne ili subkronične parenteralne izloženosti. U takvim uvjetima kadmij ulazi izravno u krvni optok, pri čemu je njegov unos višestruko veći nego u uvjetima želučanocrijevne apsorpcije. To se u ljudi događa u uvjetima profesionalne izloženosti koja je najčešća udisanjem kadmija, a u općem stanovništvu udisanjem duhanskog dima (Esteban-Vasallo i sur., 2012). U pokusima na malim glodavcima parenteralna izloženost kadmiju se postiže *in vivo* ubrizgavanjem (pr. potkožno, jednokratnim ubrizgavanjem ili otpuštanjem iz potkožnih osmotskih pumpica) (Piasek i sur., 2002; 2004).

**Hipoteze** ovog istraživanja su bile ove:

- kadmij se nakuplja u unutrašnjim organima i posteljici peroralno izloženih skotnih štakorica;
- kadmij se slabo prenosi kroz posteljicu do fetusa;
- količine esencijalnih mikroelemenata željeza, cinka i bakra u fetusu su snižene zbog nakupljanja kadmija u posteljici;
- količine posteljičnih steroidnih hormona progesterona i testosterona (kao prekursora za sintezu estradiola u jajniku) mogu biti poremećene zbog nakupljanja kadmija u posteljičnom tkivu peroralno izloženih štakorica.

Budući da je hrana najčešći put unosa kadmija u općem stanovništvu, a u literaturi su oskudni podaci o tjelesnoj razdiobi kadmija i esencijalnih elemenata u uvjetima izloženosti *per os* tijekom graviditeta, odnosno takvih podataka o učincima na steroidogenezu i u ljudi, i u pokusnih životinja praktički uopće nema, naša istraživanja su provedena na modelu pokusnih štakorica *in vivo* u uvjetima peroralne izloženosti kadmiju gotovo cijele skotnosti pri dozi od 50 mg Cd/l kadmija (u obliku klorida) u tekućini za napajanje. Pri tome su štakorice bile hranjene standardnim krmivom za male laboratorijske glodavce i imale slobodan pristup piću i hrani kako bi se imitirali uvjeti pri kojima buduće majke unose kadmij cjelokupnom prehranom, hranom i vodom, te istodobno postoje međudjelovanja kadmija i ostalih prehrambenih sastojaka, uključujući esencijalne mikronutrijente koji su bili predmetom ovoga istraživanja. Do sada u takvim uvjetima izloženosti kadmiju nisu istraživani aspekti koji su sadržani u ovome radu, učinci na funkcije posteljice u prijenosu mikronutrijenata i sintezi steroidnih hormona.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Pokusne životinje

Pokusi su provedeni na spolno zrelim štakoricama (soj Wistar uzgojen iz matične jezgre HsdBrlHan u Jedinici za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu). Životinje su tijekom pokusa držane u nastambi za pokusne životinje Jedinice za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, u kojoj su nadzirani mikroklimatski uvjeti sukladno pozitivnim zakonskim propisima: prozračivanje s 10 do 15 izmjena svježeg zraka za održavanje kakvoće unutrašnjeg zraka pri čemu je sastav zraka najbliži atmosferskom; temperatura od 20 do 22 °C, vlaga od 40 do 60% i odgovarajuće osvjetljenje uključujući 12-satnu izmjenu svjetla i tame satnim uređajem što je važno za održavanje estrusnog ciklusa životinja. Tijekom cijelog trajanja pojedinog pokusa štakorice su imale slobodan pristup (*ad libitum*) tekućini za napajanje i standardnom krmivu za pokusne miševе i štakore 4RF21 *Complete feed for mice and rats*, Mucedola, Settimo Milanese, Italija. Sastav hrane prema izvornom certifikatu je prikazan u tablici 1, a certifikati o ostalim izmjerenim pokazateljima u godinama kada su obavljani pokusi su u prilogima 1 i 2.

Za smještaj životinja tijekom pokusa upotrijebili smo dvije vrste standardnih kaveza od prozirne (polikarbonatne) plastične mase s poklopcima i dnima od nehrđajućeg čelika za držanje malih pokusnih glodavaca na koje se postavljaju standardne bočice za napajanje s nehrđajućim čepom (Ehret, Tulln, Austrija). U kavezima se nalazila sterilizirana stelja od drvenih strugotina. U srednjim kavezima (veličine 57 cm × 37 cm × 20 cm) držane su 4 štakorice, a u manjim kavezima (veličine 26 cm × 20 cm × 14 cm) su bili smješteni ženka i mužjak tijekom parenja odnosno držana jedna skotna ili neskotna ženka tijekom razdoblja izlaganja kadmiju.

Prije početka pokusa su sve životinje izvagane i raspoređene nasumično u skupine po 4 životinje u kavezu tako da su prosječne težine životinja po kavezu bile podjednake. Svaka životinja u kavezu je bila označena na repu (crnim voodootpornim markerom) s oznakama: 0, 1, 2 ili 3 crtice. Svaki je kavez označen rednim brojem. Svaki drugi dan kavezi su zamijenjeni čistima uz dodavanje čiste sterilizirane stelje od drvenih strugotina.

**Tablica 1.** Sastav standardnog krmiva za laboratorijske miševe i štakore 4RF21  
*Complete feed for mice and rats* (Mucedola, Settimo Milanese, Italija)<sup>a</sup>

<b>Sastav hrane:</b> pšenica, kukuruz, preprženi ekstrakt zrna soje, krmivo od bezglutenskih žitarica, pšenična slama, riblje brašno, brašno lucerne, dikalcijev fosfat, kalcijev karbonat, natrijev klorid, sirutka u prahu, sojino ulje, kvasci i kora lješnjaka.					
<b>Energija:</b> 3952 kcal/kg					
Analitički sastav (%)		Masne kiseline (mg/kg hrane)		Aminokiseline (mg/kg hrane)	
Vlaga	12,0	Palmitinska kiselina 16:0	4387	Arginin	10937
Proteini	18,5	Palmitoleinska kiselina 16:1	202	Cistin	3862
Ulja i masti	3,0	Stearinska kiselina 18:0	675	Lizin	9721
Vlakna	6,0	Oleinska kiselina 18:1	5046	Metionin	4454
Pepeo	7,0	Linolenska kiselina 18:2	12335	Triptofan	2826
		Linolenska kiselina 18:3	1169	Glicin	8746
Vitamini (na kg hrane)			Minerali (na kg hrane)		
Vitamin A	I.U.	14400	Fosfor	mg	7589
Vitamin D3	I.U.	1260	Kalcij	mg	9163
Vitamin B1	mg	17,2	Natrij	mg	3618
Vitamin B2	mg	15,2	Kalij	mg	8335
Vitamin B6	mg	10,7	Magnezij	mg	1980
Vitamin B12	mg	0,027	Klor	mg	4383
Vitamin E	mg	64,3	Mangan	mg	86
Vitamin K3	mg	3,2	Željezo	mg	480
Niacin	mg	95,8	Bakar	mg	25,7
Folna kiselina	mg	2,3	Cink	mg	103
d-Pantotenska kiselina	mg	24,8	Kobalt	mg	0,85
Biotin	mg	0,40	Jod	mg	1,0
Kolin	mg	2256			

<sup>a</sup>Prema certifikatu proizvođača Mucedola

([http://mucedola.it/UploadFiles/file/e4RF21\\_GLP\\_certificate.pdf](http://mucedola.it/UploadFiles/file/e4RF21_GLP_certificate.pdf))

Podaci o toksičnim sastojcima, uključujući kadmij, kao i o drugim podacima u krmivu u godinama kad je ono rabljeno u provedenim pokusima 2009. i 2010. godine su dani u prilogima 1 i 2.

Dob štakorica odabranih za pokuse je bila 10 do 13 tjedana (70 do 90 dana), a prosječne tjelesne mase oko 200 g. Svi podaci uključujući početan broj i težine štakorica na početku svakog pokusa sadržanog u ovom istraživanju su navedeni u tablici 2.

Postupci tijekom pokusa na laboratorijskim štakoricama su bili u potpunom suglasju s načelima važećeg Zakona o zaštiti životinja (NN 135/06) koji se odnosi na provođenje pokusa na malim laboratorijskim glodavcima. Provedeni su unutar razdoblja odobrenih istraživanja u okviru znanstvenoistraživačkog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske. Za provođenje istraživanja na pokusnim štakoricama su bile dobivene sve potrebne suglasnosti nadležnog Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada i službena odobrenja Uprave za veterinarstvo Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja Republike Hrvatske.

### **3.2. Izloženost kadmiju**

#### **3.2.1. Obrazloženje odabira doze kadmija i puta izloženosti**

Istraživanje je provedeno u uvjetima peroralne subkronične izloženosti štakorica kadmiju tijekom 19 odnosno 20 dana otopinom pripremljenom iz kadmijevog klorida ( $\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ ) u koncentraciji od 50 mg Cd/l. To je bila ispitivana doza u ovom istraživanju, koja je odabrana prema podacima u literaturi, uključujući rezultate prijašnjih istraživanja provedenih u jedinici u kojoj je rad izrađen, jer su pri toj razini izloženosti kadmiju opisani štetni učinci na plod bez ozbiljnih toksičnih učinaka u organizmu izravno izložene skotne štakorice.

Doza 50 mg Cd/l u otopini za napajanje je uobičajena doza i način izloženosti malih pokusnih glodavaca u *in vivo* istraživanjima reproduktivne i perinatalne toksičnosti kadmija te međudjelovanja kadmija i esencijalnih elemenata u izloženoj budućoj majci i preko nje u perinatalno izloženih potomaka. Ovo je istraživanje nadograđeno na dosadašnje rezultate i iskustva istraživača jedinice u kojoj je rad izrađen (Kostial i sur., 1993; Schönwald, 1993; Piasek i sur., 1996a; 1996b) kao i drugih autora koji su istraživali takve učinke kadmija pod sličnim uvjetima izloženosti i rabili jednaku dozu kadmija u tekućini za napajanje (Sowa i Steibert, 1985; Sorell i Graziano, 1990; Chmielnicka i Sowa, 1996) za izlaganje *per os* prije i/ili tijekom graviditeta, a u nekih i tijekom laktacije. I u najnovije vrijeme se rabe slični uvjeti izloženosti, uključujući dozu od 50 mg Cd/l u tekućini za napajanje pokusnih štakora u istraživanjima specifičnih neurotoksičnih, reproduktivnih, perinatalnih i drugih toksičnih učinaka u organizmu buduće majke i/ili u njihovih perinatalno izloženih potomaka obaju

spolova (Ronco i sur., 2009; Samuel i sur., 2011; Castillo i sur., 2012; Stolakis i sur., 2013). U prilogu 3 su prikazani literaturni podaci s glavnim rezultatima istraživanja pod jednakim ili sličnim uvjetima izloženosti kadmiju, naročito pri dozi od 50 mg/l u malih pokusnih glodavaca. Ti su nalazi obrazloženi usporedno s vlastitim rezultatima u dijelu Rasprava.

Budući da je doza od 50 mg Cd/l u vodi za piće sa slobodnim pristupom napajanja često rabljen model peroralne izloženosti, može se smatrati jednom od standardnih doza u istraživanjima reproduktivne i perinatalne toksičnosti kadmija i njegovog međudjelovanja s mikronutrijentima. Ta je doza u ovom istraživanju odabrana i za proučavanje mogućih štetnih učinaka kadmija na stvaranje steroidnih hormona u posteljici tijekom skotnosti štakorice. Pri takvom pokusnom modelu je nužno odrediti prosječan unos popijene tekućine kako bi se procijenila doza kadmija na jedinicu tjelesne mase životinje u pokusu. Iz toga se potom može procijeniti unesena količina kadmija želučanocrijevnom apsorpcijom, kako je učinjeno i opisano u dijelu Rasprava. Takav način dugotrajnog izlaganja *per os* je naročito prikladan tijekom osjetljivih razdoblja poput skotnosti i dojenja i ima prednosti pred unošenjem ispitivane tvari sondom izravno u želudac. Tako se izbjegavaju opasnosti od ozljede jednjaka s posljedičnim uginućem pokusne životinje kao i uznemiravanje i dugotrajne manipulacije skotnih pokusnih životinja koje mogu izazvati pobačaj ili prerano okoćenje, a tijekom dojenja kanibalizam mladunaca u leglu.

### **3.2.2. Priprema otopine za izlaganje**

U postupku pripreme ispitivane otopine prvo je pripremljena koncentrirana temeljna (*stock*) otopina koncentracije 200 mg Cd/l (otapanjem 358,2 mg kadmijevog klorida  $\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ , čistoće *p.a.*, Kemika, Zagreb, relativne molekularne mase 201,32) u volumenu od 1000 ml demineralizirane vode, koja je bila praktična za pohranjivanje i rukovanje. Potrebne količine kadmijevog klorida ( $\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ ) su izvagane na analitičkoj vagi podjeljka  $d=0,0001$  g (M-120, Denver Instruments, SAD). Za pripremu otopina za napajanje izloženih štakorica u željenoj dozi od 50 mg Cd/l alikvoti temeljne otopine su razrijeđeni demineraliziranom vodom (250 ml temeljne otopine do 1000 ml). Temeljna otopina i otopina za napajanje štakorica su čuvane u čistim bocama zapremine 1 l u hladnjaku na  $+4$  °C.

### 3.3. Plan pokusa

U ovom su radu procjenjivani učinci subkronične peroralne izloženosti kadmiju u dozi od 50 mg Cd/l u obliku klorida u otopini za piće tijekom skotnosti na raspodjelu kadmija i stanje esencijalnih elemenata željeza, cinka i bakra u unutrašnjim organima štakorice i fetusu te na funkcije štakorske posteljice u prijenosu nutrijenata i sintezi steroidnih hormona, progesterona i testosterona. Detalji o odabiru rabljene doze i uvjeta izloženosti detaljno su opisani u odjeljcima Obrazloženje teme, Materijali i metode (Izloženost kadmiju) i Rasprava.

Istraživanje je provedeno u okviru tri zasebna pokusa u nizu, pri čemu je prvi pokus bio orijentacioni preliminar, a unutar dva sljedeća pokusa su provedena planirana istraživanja s odgovarajućim statističkim obradama podataka unutar svakog pokusa. U tablici 2 su prikazani podaci o ukupnom broju i početnim tjelesnim masama ishodišnih skupina štakorica u pripremnoj fazi svakog pokusa, broju štakorica s četverodnevnom estrusnim ciklusima koje su se parile, broju skotnih štakorica te oznakama i broju životinja u pojedinim ispitivanim skupinama na početku svakog pokusa. Kao početak pokusa je označen početak peroralnog izlaganja kadmiju u dozi od 50 mg Cd/l u tekućini za napajanje što je u gravidnih ženki bio i početak skotnosti.

Značajke pojedinog provedenog pokusa mogu se sažeti ovako:

**Pokus 1 (preliminarnan pokus) – proveden na skotnim štakoricama**, na malom početnom broju životinja ( $N=20$ ) i minimalnom broju štakorica u pokusnim skupinama ( $N=3$ ) kako bi se dobio orijentacioni uvid u razlike ispitivanih pokazatelja u štakorica izloženih kadmiju u dozi od 50 mg Cd/l u vodi za piće od 1. do 19. dana skotnosti u usporedbi s kontrolama. Tijekom pokusa su razrađivani protokoli, dobiven uvid u očekivani postotak skotnosti i uvjete izlaganja te razvijani postupci uzorkovanja i priprema uzoraka za planirane analize elemenata i steroidnih hormona (Katić i sur., 2008). Također je izračunat najmanji potreban broj skotnih životinja što je primijenjeno poslije u *Pokusima 2 i 3* na temelju rezultata *Pokusa 1* o učinku kadmija na promjenu količina spolnih hormona u posteljici. Uzete su u obzir dobivene srednje vrijednosti i standardne devijacije posteljičnih hormona u izloženoj i neizloženoj skupini u *Pokusu 1* te razlike u posteljičnoj koncentraciji spolnih hormona od 30% između izloženih životinja i kontrola i izračunato je da je za postizanje snage od 0,80 u Studentovom  $t$ -testu za nezavisne uzorke pri razini značajnosti  $\alpha = 0,05$  najmanji potrebni broj životinja 8 skotnih ženki po skupini. Stoga je u *Pokusima 2 i 3* bilo planirano uključiti 10 skotnih ženki u svakoj ispitivanoj skupini.

**Pokus 2** – **proveden na skotnim štakoricama**, na većem početnom broju životinja ( $N=40$ ) i skupinama štakorica izloženima kadmiju u dozi od 50 mg Cd/l u vodi za piće od 1. do 19. dana skotnosti i usporednoj kontroli, u svrhu daljnjeg razvoja plana pokusa, poboljšanja uvjeta i odgovarajućih priprema uzoraka, planiranja analiza i statističke obrade.

**Pokus 3** – **proveden na skotnim u usporedbi s neskotnim štakoricama**, na većem početnom broju životinja ( $N=46$ ) i skupinama štakorica izloženima kadmiju u dozi od 50 mg Cd/l u vodi za piće od 1. do 20. dana skotnosti, odnosno istodobno tijekom 20 dana na neskotnim štakoricama pod jednakim uvjetima izloženosti. Rabljene su suvremene metode razaranja uzoraka prije analiza elemenata čime je bitno smanjena mogućnost onečišćenja uzoraka neizloženih životinja (što je uočeno kao nepovoljna okolnost u prethodnim pokusima). Procjenjivani su pokazatelji steroidogeneze uporabom dviju imunokemijskih metoda radi usporedbe analiza u izloženih skotnih štakorica blizu roka okoćenja u uvjetima peroralne izloženosti kadmiju gotovo cijelo razdoblje skotnosti (Mikolić i sur., 2014; Piasek i sur., 2014).

**Tablica 2.** Pregled provedenih pokusa s podacima o ishodišnim skupinama štakorica (na početku pripremne faze prije početka pokusa) te o broju štakorica i oznakama skupina tijekom peroralnog izlaganja kadmiju u dozi od 50 mg Cd/l u tekućini za napajanje u pojedinom pokusu

Pokus	Podaci o ishodišnim skupinama štakorica u pripremnoj fazi pokusa				Ukupan broj i skupine štakorica tijekom izlaganja kadmiju		
	Ukupan broj (N)	Početne tjelesne mase (g)	<sup>a</sup> Broj štakorica koje su se parile (N)		Broj (N)	Oznaka skupine (opis)	
			Ukupno	Skotne			
<u>Pokus 1</u>	20	250±27,5	12	8	3 3	Kontrola Izložene	(skotne štakorice)
<u>Pokus 2</u>	40	168±18,7	34	20	9 11	Kontrola Izložene	(skotne štakorice)
<u>Pokus 3</u>	46	180±15,9	32	26	14 10	Kontrolna Izložena	(skotne štakorice)
			–	–	5 15	Kontrola Izložene	(neskotne štakorice)

Rezultati tjelesne mase izraženi su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

<sup>a</sup>Štakorice za koje je utvrđen ujednačen četverodnevni estrusni ciklus tijekom četiri tjedna praćenja rodničkih razmaza.

Na tablici 2 je vidljivo da je postotak skotnih štakorica u svakom pokusu bio oko 50% od početnog broja upotrijebljenih životinja.



### 3.3.1. Postupci tijekom istraživanja

Unutar svakog pokusa su provedeni postupci koji se mogu svrstati u ove četiri cjeline:

- A) Određivanje faza estrusnog ciklusa** i utvrđivanje štakorica s ujednačenim četverodnevnom ciklusima;
- B) Razvrstavanje štakorica u pokusne skupine** nakon odabira štakorica za parenje i utvrđivanja skotnosti;
- C) Početak pokusa s peroralnim izlaganjem štakorica kadmiju** u dozi od 50 mg Cd/l tekućinom za napajanje u skotnih štakorica (*Pokusi 1 i 2*) odnosno u skotnih i neskotnih štakorica (*Pokus 3*) i postupci tijekom izlaganja;
- D) Postupci i uzorkovanje na završetku pokusa** 19. ili 20. dana peroralnog izlaganja kadmiju.

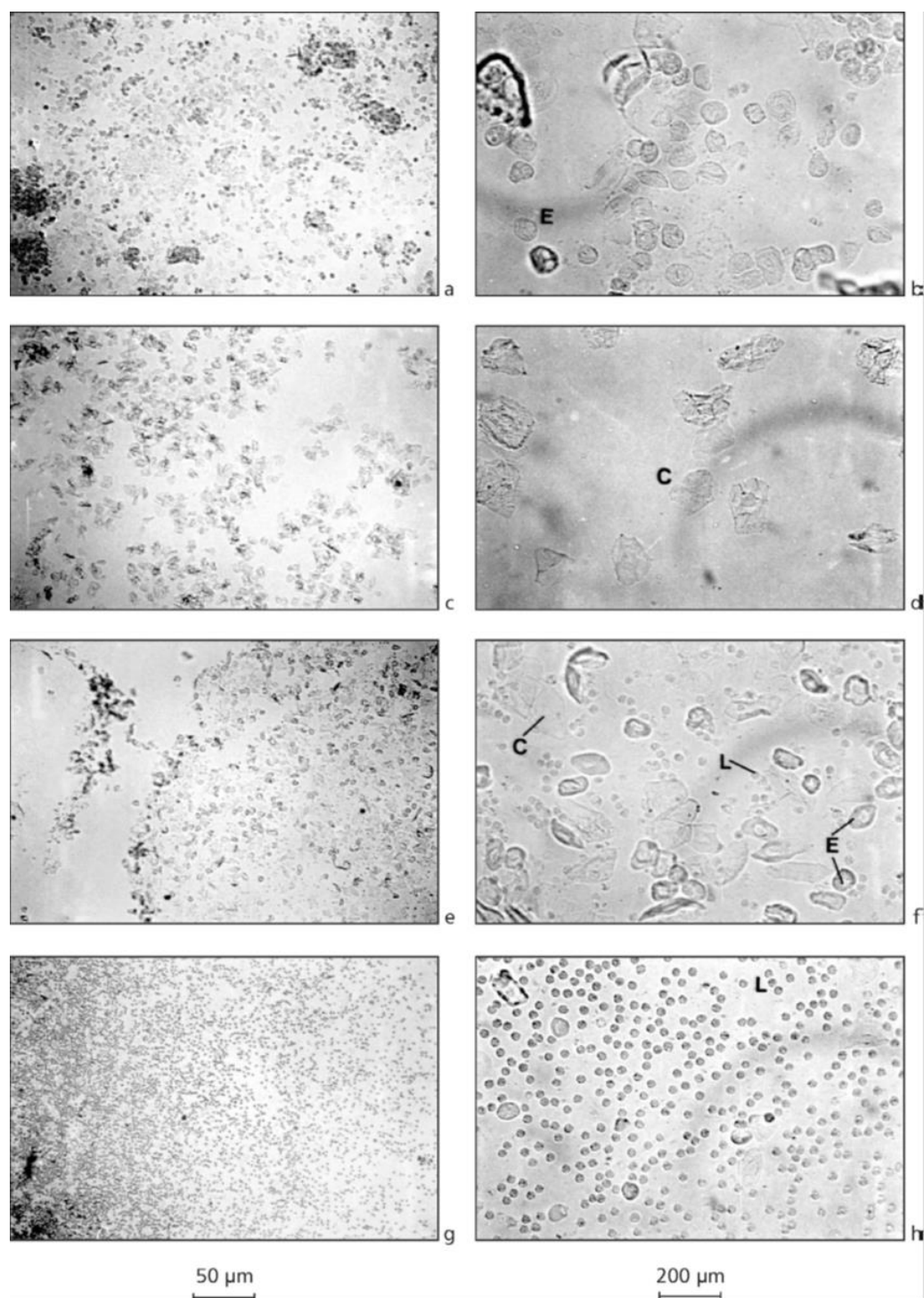
#### A) Određivanje faza estrusnog ciklusa

Reproduktivni ciklus štakorica naziva se estrusni ciklus i najčešće traje 4 ili 5 dana. Sastoji se od četiri uzastopne faze različitog trajanja: proestrus (P), estrus (E), metestrus ili diestrus I (D1) i diestrus ili diestrus II (D2). U razdoblju između proestrusa do kraja estrusa dolazi do ovulacije. Svaku od četiri faze ciklusa karakteriziraju različiti udjeli triju vrsta stanica u ispirku rodnice: kubične epitelne stanice, pokrovne pločaste epitelne stanice i leukociti (Fox i Laird, 1970; Marcondes i sur., 2002). U tablici 3 su prikazani udjeli pojedine vrste stanica, trajanje i ponašanje štakorice u pojedinoj fazi estrusnog ciklusa.

**Tablica 3.** Nazivi i značajke pojedinih faza estrusnog ciklusa štakorica (preuzeto prema Fox i Laird, 1970)

Naziv faze estrusnog ciklusa (kratica)	Vrste stanica u vidnom polju pod svjetlosnim mikroskopom	Trajanje	Ponašanje štakorice u blizini mužjaka
<b>PROESTRUS (P)</b>	epitelne stanice s jezgrom	12 h	prihvatanje mužjaka blizu završetku faze
<b>ESTRUS (E)</b>	pokrovne pločaste epitelne stanice	12 h	prihvatanje mužjaka i parenje
<b>METESTRUS (DIESTRUS 1, D1)</b>	leukociti, pokrovne pločaste epitelne stanice i epitelne stanice s jezgrom	21 h	neprihvatanje mužjaka
<b>DIESTRUS (DIESTRUS 2, D2)</b>	leukociti	57 h	neprihvatanje mužjaka

Faze estrusnog ciklusa štakorica smo utvrđivali citološkim pregledom ispiraka rodnice pod svjetlosnim mikroskopom s povećanjima  $160\times$  i  $320\times$ . Svakog jutra u isto vrijeme (oko 9,00 h) tijekom četiri tjedna smo uzimali rodničke ispirke kapaljkom i uporabom mlake obične vodovodne vode. Po jednu kap ispirka rodnice svake štakorice nanosili smo redom (prema oznakama štakorica u kavezima) na staklenu pločicu s jažicama. Nakon toga smo u ispircima svjetlosnim mikroskopom određivali vrste oljuštenih stanica epitela rodničke sluznice u vidnom polju među kojima smo razlikovali tri vrste stanica: epitelne stanice s jezgrom (velike okrugle svijetle stanice s jezgrom), pokrovne pločaste epitelne stanice bez jezgre (velike stanice nepravilnog oblika) i leukocite (okrugle stanice s jezgrom koje su znatno manje od epitelnih stanica). Pojedinu fazu estrusnog ciklusa za promatrani dan smo utvrdili na temelju vrsta i brojčanog odnosa karakterističnih vrsta stanica kako prikazuje slika 3. Udjele pojedinih stanica u vidnom polju i procijenjenu fazu estrusnog ciklusa smo zabilježili u dnevnik pokusa, u obrasce za svakodnevna očitavanja faze ciklusa i tako pratili estrusni ciklus svake štakorice.



**Slika 3.** Fotomikrografski prikaz vidnog polja pod svjetlosnim mikroskopom u pojedinim fazama estrusnog ciklusa štakora: **a, b** – proestrus (P); **c, d** – estrus (E); **e, f** – metestrus (D1); **g, h** – diestrus (D2). Stanice označene unutar slike pojedine faze: L - leukociti; E - epitelne stanice s jezgrom; C - pokrovne pločaste epitelne stanice bez jezgre (preuzeto iz: Marcondes i sur., 2002).

## B) Razvrstavanje štakorica u pokusne skupine

Na temelju rezultata praćenja citoloških nalaza u rodničkim ispircima tijekom četiri tjedna utvrdili smo štakorice s ujednačenim četverodnevnom estrusnim ciklusom i u njih je bilo moguće predvidjeti vrijeme kada će biti spremne za parenje. To je na dan proestrusa, nakon čega preko noći slijedi faza estrusa kada štakorica dozvoljava kopulaciju i može zanijeti.

Na dan utvrđenog proestrusa štakorice s ujednačenim estrusnim ciklusom smo stavili u pojedinačne male kaveze s neizloženim mužjacima (u omjeru 1:1) i ostavili ih preko noći. Sljedećeg jutra smo izvadili mužjaka iz kaveza i pregledali svaku štakoricu ima li u otvoru rodnice sluzni čep zaostao nakon parenja što upućuje da je ženka vjerojatno zanijela. Svakoj štakorici smo potom uzeli rodnički ispirak i pregledali ga pod svjetlosnim mikroskopom. Ako smo između pokrovnih pločastih epitelnih stanica karakterističnih za estrus vidjeli spermije štakoricu smo smatrali skotnom i taj dan smo označili prvim danom skotnosti i prvim danom pokusa (dan pokusa 1, DP1).

Štakorice koje smo ocijenili skotnima smo izvagali (na vagi PE 1600, Mettler, Švicarska) i razvrstali u pokusne skupine na način da su imale približno jednaku prosječnu početnu tjelesnu masu i da je bio jednak broj štakorica po skupini. Budući da sve štakorice nisu bile skotne, tek je prilikom uzorkovanja na kraju pokusa utvrđen njihov konačan broj po skupinama, kako je prikazano u tablici 2. i u ostalim tablicama u dijelu Rezultati.

U svim pokusima smo oblikovali ove dvije skupine pokusnih štakorica (*Pokusi 1-3*):

- skotne neizložene, kontrolne štakorice (*Kontrola*);
- skotne štakorice izložene dozi 50 mg Cd/l *per os* u tekućini za napajanje (*Izložene*).

Jedino su u trećem pokusu u nizu (*Pokus 3*), pored gore opisanih pokusnih skupina, postojale još dvije dodatne skupine sastavljene od preostalih štakorica za koje je utvrđeno da nisu bile skotne, ili da nisu imale ujednačene četverodnevne estrusne cikluse pa se nisu parile:

- neskotne neizložene, kontrolne štakorice (*Kontrola – neskotne*);
- neskotne štakorice izložene dozi 50 mg Cd/l *per os* u tekućini za napajanje (*Izložene – neskotne*).

I te su pokusne skupine na početku izlaganja kadmiju imale podjednake prosječne tjelesne mase po skupini kako bi se mogli uspoređivati promatrani pokazatelji po skupinama.

Skotnim štakoricama smo sljedećih nekoliko dana pokusa još citološki pratili rodničke ispirke kako bismo se uvjerali da su prestale ciklirati, odnosno da su zanijele. Citološki nalaz

koji je odgovarao značajkama metestrusa (D1) je bio dodatna potvrda o skotnosti. Podatke smo zabilježili za svaku štakoricu na pripremljeni obrazac.

S obzirom na to da sve štakorice nisu bile u jednakoj fazi estrusnog ciklusa svaki dan, nisu se ni parile isti dan, pa su opisane pokusne skupine štakorica u sva tri pokusa oblikovane unutar 3-4 uzastopna dana. U svih skotnih štakorica, prvi dan skotnosti je bio prvi dan pokusa, odnosno prvi dan izlaganja kadmiju u izloženih štakorica. U *Pokusu 3*, u neskotnih kontrolnih i izloženih štakorica prvi dan pokusa je bio na dan početka izlaganja kadmiju izloženih štakorica. Rezultati svih mjerenja i analiza provedenih tijekom pojedinog pokusa prikazani su skupno po pokusima i ispitivanim skupinama nakon što su tijekom statističke obrade podataka isključene razlike zbog pomaka u kalendarskom datumu početka, odnosno završetka pokusa za pojedinu štakoricu.

### **C) Početak pokusa s peroralnim izlaganjem štakorica kadmiju**

Skupine izloženih skotnih odnosno neskotnih štakorica su napajane otopinom kadmijevog klorida u demineraliziranoj vodi (čija je priprema opisana u točki 3.2.2), u dozi od 50 mg Cd/l od 1. do 19. dana skotnosti (*Pokusi 1 i 2*) ili od 1. do 20. dana skotnosti odnosno 1. do 20. dana pokusa za istodobno izlagane neskotne štakorice pod jednakim uvjetima izloženosti (*Pokus 3*). Kontrolne skotne i neskotne štakorice su napajane demineraliziranom vodom. Pristup piću je bio slobodan (*ad libitum*).

Tjelesne mase štakorica su izvagane u svakom pokusu prvi dan pokusa, potom svaki tjedan i na kraju pokusa, devetnaestog odnosno dvadesetog dana izlaganja kadmiju. Sve vrijednosti su zabilježene. Iz tih vrijednosti smo izračunali prosječne tjelesne mase životinja unutar pokusne skupine za pojedini dan mjerenja kao i prosječne priraste tjelesne mase štakorica unutar skupine tijekom prve odnosno druge polovice graviditeta tj. prve odnosno druge polovice trajanja pokusa.

Tijekom trajanja svakog pokusa su mjerene prosječne potrošnje krmiva i pića.

Potrošnja (pojedena količina) krmiva je izvagana (PE 1600, Mettler, Švicarska) za svaku životinju u pokusu dva puta tjedno (svakog ponedjeljka i četvrtka) iz razlika vrijednosti količine postavljene i nađene količine hrane. Iz dobivenih smo podataka izračunali prosječan unos krmiva po danu za svaku štakoricu i potom za pojedinu skupinu tijekom prve i druge polovice skotnosti/trajanja pokusa, kao i za čitavo vrijeme trajanja pokusa. Rezultate smo izrazili kao prosječne vrijednosti po skupini u gramima na dan.

Unos popijene tekućine očitavali smo svaki dan. Iz zabilježenih vrijednosti smo izračunali prosječan unos tekućine za svaku štakoricu na dan odnosno za svaku pojedinu skupinu tijekom prve i druge polovice skotnosti/trajanja pokusa, kao i za čitavo vrijeme trajanja pokusa. Rezultate smo izrazili kao prosječne vrijednosti po skupini u mililitrima na dan. Iz dobivenih podataka o prosječnom unosu tekućine na dan za svaku štakoricu izloženu kadmiju u piću smo izračunali i prosječan unos kadmija na dan izražen u miligramima na kilogram tjelesne mase za svaku izloženu životinju odnosno izloženu skupinu u svakom pokusu.

#### **D) Postupci i uzorkovanje na završetku pokusa**

Pokusi su završeni 19. dana (*Pokusi 1 i 2*) ili 20. dana (*Pokus 3*) izloženosti kadmiju što je bilo blizu roka okoćenja skotnih štakorica. Budući da je planirano uzorkovati posteljice, trebalo je okončati pokuse prije negoli štakorica počne kotiti mladunce, što je između 21. i 23. dana skotnosti, jer prilikom okoćenja očisti i poždere sva okoćena tkiva oko mladunaca.

Posljednjeg dana pokusa smo svakoj štakorici izmjerili potrošnju krmiva i popijene tekućine, izvagali je i podatke zabilježili u dnevnik pokusa. Životinjama je dana opća anestezija intraperitonealnim ubrizgavanjem kombinacije anestetika Narketana u dozi od 0,8 ml/kg i Xylapana u dozi od 0,6 ml/kg tjelesne mase (proizvođač obaju anestetika je Vetoquinol AG, Ittigen, Švicarska). Dozu svakog anestetika smo prilagodili izvaganoj tjelesnoj masi štakorice, a u skotnih smo je nerijetko još morali i nešto povećati ako nije bila djelotvorna, što je moguće jer se anestetici raspoređuju u obilno masno tkivo i gravidni uterus tako da je skotnu ženku teže uspavati negoli neskotnu. Svaka je štakorica u općoj anesteziji potom postavljena leđima na upijajuću podlogu i fiksirana.

Prvo je otvorena trbušna šupljina i uzorkovana krv iz srca. U preliminarnom pokusu (*Pokusu 1*) smo krv iz srca uzorkovali u staklenu čašicu i uzorke krvi za analizu elemenata pripremali metodom suhog razaranja kao i tkiva. U sljedeća dva pokusa (*Pokusi 2 i 3*) smo izvadili krv ubadanjem srca i skupili u dvije epruvete s podtlakom (*Vacutainer system*). Prvi uzorak za analizu elemenata u punoj krvi je izvađen u plastičnu epruvetu obloženu antikoagulansom K<sub>2</sub>EDTA (*BD Vacutainer®*, *Trace Element K<sub>2</sub>EDTA*, Franklin Lakes, New Jersey, SAD), a drugi uzorak za određivanje steroidnih hormona u serumu je izvađen u plastičnu epruvetu bez antikoagulansa (*BD Vacutainer®*, *Trace Element Serum*, Franklin Lakes, New Jersey, SAD). Uzorke pune krvi smo pohranili do analize na uspravnom stalku u hladnjaku na temperaturi +4 °C. Krv za određivanje steroidnih hormona u serumu smo

centrifugirali na 3000 rpm/15 min (centrifuga ROTANTA/R, Hettich, Njemačka), serume smo odvojili dekantiranjem i pohranili do analize u začepljenim Eppendorf epruvetama u zamrzivaču na -20 °C. Iz srca smo također uzeli i po dva usporedna uzorka krvi za analizu hematokrita u krvi majke u originalne heparinizirane kapilarne cjevčice (*Pokusi 2 i 3*). Postupci određivanja hematokrita su opisani u sljedećem poglavlju.

U skotnih štakorica smo nakon toga otvorili trbušnu šupljinu i izvadili maternicu s plodovima i jajnike te ih postavili na upijajuću podlogu. Odvojili smo desni i lijevi jajnik, očistili ih od okolnog tkiva i na svakom prebrojali žuta tijela. Gravidnu maternicu smo razrezali uz rub po ispupčenim plodnim mjehurima, od kraja desnog roga preko sredine do kraja lijevog roga, otvorili je i prebrojali ukupan broj zametaka (implantanata) u svakom rogu maternice, uključujući sve posteljično-fetalne jedinice i mjesta s rano ili kasno odbačenim (resorbiranim) plodovima. Sve podatke smo zabilježili. Nakon toga smo otvorili svaki plodni mjehur zarezivanjem ovojnice pri čemu je istekla plodna voda i prikazali su se posteljica i fetus.

Sve posteljice i fetuse smo izvadili, postavili na upijajuću podlogu, stavili u niz kako su bili poredani u maternici u plastične ladice i izvagali njihove ukupne svježe mase na vagi podjeljka  $d=0,001$  g (PM 400, Mettler, Švicarska) što smo zabilježili. Izračunali smo prosječne mase svježeg tkiva posteljice i fetusa za svaku štakoricu i pojedinu pokusnu skupinu. Za svaku skotnu štakoricu smo iz dva fetusa postraničnim zarezivanjem na vratu sakupili uzorke krvi usporedno u dvije originalne heparinizirane kapilarne cjevčice za analizu hematokrita. Po 1 ili 2 krajnja fetusa iz svakog roga maternice smo izdvojili za analize elemenata i nakon vaganja ih stavili u staklene čašice (*Pokus 1*) odnosno u visoke staklene epruvete (*Pokus 2*) gdje su pripremani za analize metodom suhog razaranja (*Pokus 1*) i metodom mokrog razaranja uzoraka (*Pokus 2*). U *Pokusu 3* smo fetuse pohranili u označenim plastičnim posudicama u kojima su čuvani u zamrzivaču na -20 °C do pripreme uzoraka za analize metodom visokotlačnog mikrovalnog razaranja. Odvojili smo po jednu krajnju posteljicu iz svakog roga maternice i izvagali za postizanje minimalno 0,5 g svježe mase tkiva za analize elemenata. Posteljice smo stavili u staklene čašice (*Pokusi 1 i 2*), nakon čega su pripremane metodom suhog razaranja uzoraka, a u zadnjem pokusu (*Pokusu 3*) smo ih jednako kao i fetuse pohranili u plastičnim posudicama u zamrzivaču na -20 °C do pripreme tkiva za analize metodom visokotlačnog mikrovalnog razaranja. Također smo izdvojili po 2 krajnje posteljice iz svakog roga maternice za određivanje posteljičnih steroidnih hormona, izvagali ih za postizanje minimalno 1,2 g svježe mase tkiva i pohranili u Eppendorf

epruvetama u zamrzivaču na -20 °C do pripreme uzoraka za analize. Sve podatke smo zabilježili u pripremljene tablice.

Štakorice su potom iskrvarene zarezivanjem trbušne aorte pri čemu su bile usmrćene, makroskopski su pregledani unutrašnji organi *in situ*, izvađena cijela jetra, desni i lijevi bubreg (za analize elemenata smo uzeli samo desni bubreg). Nakon disekcije svaki je organ prvo stavljen na upijajuću podlogu i očišćen od okolnog tkiva. Svježe mase organa su izvagane i podaci zabilježeni jednako kao i u postupcima s uzorcima fetusa i posteljica. Nakon vaganja, izdvojili smo 3 izreska jetrenog tkiva, jedan središnji i po dva krajnja dijela, ukupne mase od 1 do 2 g svježe mase tkiva (ovisno o načinu daljnje pripreme uzoraka) i zabilježili izmjerene vrijednosti. Dijelovi tkiva jetre i desni bubreg namijenjeni za analize elemenata su pohranjeni u staklene čašice (*Pokusi 1 i 2*) i pripremani metodom suhog razaranja uzoraka za analize, odnosno u plastične zatvorene posudice (*Pokus 3*) i uzorci tkiva pohranjeni u zamrzivaču na -20 °C do postupka pripreme uzoraka za analize metodom visokotlačnog mikrovalnog razaranja.

### **3.4. Priprema tkiva za analize elemenata**

#### **3.4.1. Suho razaranje uzoraka**

Metodu suhog razaranja uzoraka tkiva prije analize elementa smo primijenili u prva dva pokusa (*Pokusi 1 i 2*). Uzorci pune krvi štakorica u *Pokusu 1* su pripremljeni jednako kao i uzorci jetre, bubrega, posteljice i fetusa, koji su svi nakon uzorkovanja stavljeni u prethodno izvagane staklene čašice volumena 25 ml (Boral, Pula) i sušeni tijekom 24 h na temperaturi 105 °C u sušioniku ST 01/02 (Instrumentarija, Zagreb). Nakon hlađenja, uzorci su izvagani i u staklenim čašicama stavljeni u mufolnu peć (Gallenkamp, Engleska) gdje su spaljeni tijekom 24 h uz postupno podizanje temperature do 450 °C. Nakon završetka razaranja, pepeo uzoraka je ohlađen stajanjem u mufolnoj peći do sljedećeg dana i nakon toga je svaki uzorak otopljen u staklenim čašicama dodavanjem 0,25 ml odnosno 0,5 ml (na uzorke krvi u *Pokusu 1*) koncentrirane dušične kiseline (65%-tna HNO<sub>3</sub>, čistoće *p.a.*, Merck, Njemačka) na grijaćoj ploči do isparavanja kiseline. Stijenke staklenih čašica su isprane dodavanjem deionizirane vode (do 1 ml) na grijaćoj ploči dok voda nije proključala. Nakon hlađenja, otopinama u staklenim čašicama je dodana deionizirana voda do 5 g odnosno 10 g na uzorke krvi (*Pokus*



1) (Blanuša i Breški, 1981). Pripremljeni uzorci su prebačeni iz staklenih čašica u označene polipropilenske epruvete s čepom i pohranjeni u hladnjaku na +4 °C do analiza elemenata.

### 3.4.2. Mokro razaranje uzoraka

Uzorci cijelih fetusa su pripremljeni za analize mokrim razaranjem u drugom pokusu (*Pokus 2*). Uzorcima fetusa stavljenima u prethodno izvagane visoke staklene epruvete je dodano 2 ml koncentrirane dušične kiseline (65%-tna HNO<sub>3</sub>, čistoće *p.a.*, Merck, Njemačka). Nakon stajanja preko noći na sobnoj temperaturi, epruvete su sljedećeg dana začepljene plastičnim čepovima na navoj s teflonskom membranom i stavljene na razaranje u aluminijski grijaći blok (Digestion System, DS-40, Tecator, Švedska) gdje je temperatura postupno dizana do 80 °C. Temperaturni program za razaranje uzoraka prikazan je u tablici 4 prema protokolu laboratorija jedinice u kojoj je rad izrađen.

**Tablica 4.** Temperaturni program za razaranje uzoraka u aluminijskom grijačem bloku *Digestion System*, DS-40 (Tecator, Švedska), prema Matek i Blanuša (1998)

Parametar	Faza		
	1.	2.	3.
Temperatura / °C	50	60	80
Vrijeme porasta temperature / min	10	10	10
Vrijeme digestije pri određenoj temperaturi / min	30	30	300

Nakon razaranja i hlađenja uzoraka, otopinama je dodana deionizirana voda do 10 g te su izmiješani na miješalici za epruvete (Jureša i Blanuša, 2003). Pripremljeni uzorci su prebačeni u označene polipropilenske epruvete s čepom i pohranjeni u hladnjaku na +4 °C do analiza elemenata.

### 3.4.3. Visokotlačno mikrovalno razaranje uzoraka

U trećem pokusu (*Pokus 3*) uzorci jetre, bubrega, posteljica i fetusa su pripremljeni za analize elemenata u suvremenom uređaju s visokotlačnim mikrovalnim razaranjem UltraCLAVE IV (Milestone S.r.l., Sorisole, Italija) metodom za razaranje bioloških uzoraka. Svi prethodno pohranjeni i zaleđeni uzorci su nakon odleđivanja prebačeni iz plastičnih posudica u prethodno izvagane kvarcne epruvete. Na uzorke jetre, bubrega i posteljice je dodano po 2 ml koncentrirane dušične kiseline i 2 ml ultra čiste vode, dok je na uzorke fetusa dodano 4 ml koncentrirane dušične kiseline i 2 ml ultra čiste vode radi veće mase uzorka. Rabljena je koncentrirana  $\text{HNO}_3$  dobivena pročišćavanjem 65%-tne  $\text{HNO}_3$  čistoće *p.a.* (Merck, Njemačka) u sustavu SubPUR (Milestone S.r.l., Sorisole, Italija) za destilaciju kiselina. Epruvete su začepljene teflonskim čepovima i posložene na odgovarajući stalak.

Uzorci su razarani prema temperaturnom programu prikazanom u tablici 5.

**Tablica 5.** Temperaturni program za razaranje uzoraka u visokotlačnom mikrovalnom uređaju UltraCLAVE IV (Milestone S.r.l., Sorisole, Italija)

Faza	t / min	E / W	T <sub>1</sub> / °C	T <sub>2</sub> / °C	p / Pa
1.	6	700	70	80	$1 \times 10^7$
2.	15	700	140	80	$1 \times 10^7$
3.	7	1000	210	80	$1,2 \times 10^7$
4.	8	1000	250	80	$1,4 \times 10^7$
5.	15	800	250	80	$1,4 \times 10^7$
6.	30	0	20	70	$2 \times 10^6$

Budući da je prosječna masa uzorka fetusa bila veća nego mase ostalih uzoraka, tijekom postupka visokotlačnog mikrovalnog razaranja tih uzoraka smo produžili vrijeme do postizanja najviše temperature zagrijavanja u fazi 3. Nakon razaranja i hlađenja uzorci su nadopunjeni ultra čistom vodom do 10 g, izmiješani na miješalici za epruvete, prebačeni u polipropilenske epruvete s čepom i pohranjeni u hladnjaku na +4 °C do analize elemenata.

### 3.5. Priprema uzoraka tkiva posteljice za analize steroidnih hormona

Uzorke tkiva posteljica za analize steroidnih hormona smo pripremali na izvoran način koji je prethodno razrađen za uzorke ljudskih posteljica i po prvi puta je primijenjen na uzorcima posteljica pokusnih štakorica. Slijedili smo metode koje su opisali Wilson i suradnici (1984) za pripremu uzoraka ljudskih posteljica i koje su, u modificiranom obliku, uvedene u jedinici u kojoj je ovaj rad izrađen za postupke prije analiza steroidnih hormona u ljudskim posteljicama (Piasek i sur., 2001; 2002; Stasenکو i sur., 2010). Te postupke smo dodatno prilagodili za pripremu uzoraka štakorskih posteljica.

Nakon odleđivanja uzorke posteljica smo usitnili škalicama u staklenim čašicama, dolili 5 ml 75%-tnog etanola i prenijeli ih u staklene epruvete za homogeniziranje. Epruvete smo začepili, sadržaj dobro promiješali miješalicom za epruvete i pohranili preko noći u hladnjaku na +4°C. Na taj način su se ekstrahirali steroidni hormoni iz posteljičnog tkiva. Sljedećeg jutra smo nakon miješanja sadržaja u epruvetama na miješalici sadržaj homogenizirali na ledu laganim pomicanjem ručnog homogenizatora (Homogenizer Power Gen 125, Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, UK). Od homogenata svakog uzorka otpipetirali smo dva usporedna alikvota od po 500 µl u 2 polietilenske epruvete od 5 ml i dodali 3 ml 75%-tnog etanola. U oba koraka 75%-tni etanol je bio pripremljen razrjeđivanjem 96%-tnog EtOH, čistoće *p.a.* (Kemika, Zagreb). Nakon miješanja tako dobivenog sadržaja u epruvetama na miješalici, svaki uzorak smo razdijelili u dvije Eppendorf epruvete. Uzorke smo centrifugirali na 15000 rcf (g)/15 min (Eppendorf Centrifuge 5417 R, Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Njemačka) i otpipetirali supernatant volumena 1,5 ml u polietilenske epruvete, koje smo začepili i pohranili u zamrzivač na -20 °C. Zamrznuti supernatanti su nakon toga liofilizirani tijekom 24 sata na temperaturi -50 °C u uređaju za liofilizaciju (Hetosic, Heto, Birkerød, Denmark). Liofilizati supernatanata dobiveni obradom uzoraka štakorskih posteljica su pohranjeni na -20 °C do analiza steroidnih hormona, progesterona i testosterona.

### 3.6. Analiza uzoraka

#### 3.6.1. Određivanje koncentracija i količina kadmija

Tijekom istraživanja su u sva tri pokusa koncentracije kadmija u punoj krvi štakorica i količine kadmija u uzorcima organa štakorica odnosno fetusu, bez obzira na prethodne načine pripreme uzorka, određivani elektrotermičkom tehnikom atomske apsorpcijske spektrometrije (ET-AAS) na instrumentu Perkin Elmer AAnalyst 600 (Perkin Elmer, SAD) sa Zeemanovom korekcijom pozadinskog zračenja. Instrumentalni uvjeti i temperaturni program za analizu kadmija su prikazani u tablicama 6. i 7. Kao inertni plin je upotrijebljen argon (UTP d.o.o., Zagreb, Hrvatska – SOL Group, Italija), čistoće  $\geq 99,999\%$ . Modifikator matrice prilikom mjerenja kadmija je bila kombinacija 0,12 g/l magnezija [*Magnesium Matrix modifier*,  $\gamma(\text{Mg}) = 10,0 \pm 0,2$  g/l ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  u ca. 17%-tnoj  $\text{HNO}_3$ ) Merck, Njemačka] i 1 g/l paladija [*Palladium Matrix modifier*,  $\gamma(\text{Pd}) = 10,0 \pm 0,2$  g/l ( $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  u ca. 15%-tnoj  $\text{HNO}_3$ ) Merck, Njemačka].

**Tablica 6:** Instrumentalni uvjeti za određivanje kadmija tehnikom ET-AAS (Perkin Elmer AAnalyst 600)

Izvor svjetla	bezelektrodna žarulja uz izbijanje (EDL)
Valna duljina mjerenja / nm	228,8
Jakost struje / mA	250
Širina pukotine monokromatora / nm	0,7
Volumen injicirane mjerne otopine / $\mu\text{l}$	10
Volumen injiciranog modifikatora / $\mu\text{l}$	5
Vrijeme integracije signala / s	5
Konstrukcija grafitne kivete	transverzalno grijana grafitna kiveta (THGA <i>graphite tube</i> )
Način mjerenja	površina signala
Broj ponovljenih mjerenja	2

**Tablica 7:** Temperaturni program grafitne peći za određivanje kadmija tehnikom ET-AAS (Perkin Elmer AAAnalyst 600)

Korak	T / °C	Vrijeme podizanja temperature / s	Vrijeme održavanja temperature / s
Sušenje 1	110	1	30
Sušenje 2	130	15	30
Piroliza	600	10	20
Atomizacija	1600	0	5
Čišćenje	2450	1	3

Svi pripremljeni uzorci su prije mjerenja razrijeđeni 1 %-tnom HNO<sub>3</sub> kako bi izmjerene koncentracije analita bile unutar mjernog područja. Uzorci slijepe probe su pripremani na jednak način kao i uzorci tkiva samo što je umjesto uzorka razorenog tkiva korištena deionizirana voda.

Za mjerenje kadmija u uzorcima pune krvi štakorica (*Pokusi 2 i 3*) je upotrijebljena metoda mjerenja u deproteiniziranoj krvi što je uključivalo prethodno razrjeđenje krvi (100 µl) otopinama Triton X-100 (400 µl), 1% HNO<sub>3</sub> (50 µl) i 1,58 mol/l HNO<sub>3</sub> (450 µl). Tako pripremljeni uzorci krvi su centrifugirani na 10000 rpm/10 min (Eppendorf Centrifuge 5417 R, Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Njemačka) i koncentracija kadmija mjerena u supernatantu prema prije uvedenoj i opisanoj metodi u laboratoriju jedinice u kojoj je ovaj rad izrađen (Jurasović i Telišman, 1993).

Odgovarajuće standardne otopine za određivanje kadmija su pripremane u koncentracijama od 1 do 40 µg Cd/l iz ishodne otopine koncentracije 1000 mg Cd/l [*Cadmium standard solution*, Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> × 4H<sub>2</sub>O u HNO<sub>3</sub> 0,5 mol/l, Merck, Njemačka]. Otopine standarda su uvijek pripremane i pohranjivane u iste plastične bočice prethodno isprane deioniziranom vodom.

Pouzdanost metoda i točnost određivanja koncentracije kadmija u punoj krvi, odnosno količine kadmija u uzorcima organa je provjeravana mjerenjem ovih referentnih materijala: Seronorm<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood L-1 i Seronorm<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood L-2 (Sero AS, Billingstad, Norveška), uzoraka liofiliziranih tkiva goveđe jetre (Bovine Liver SRM 1577b, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland, SAD) i svinjskog bubrega (Pig Kidney CRM 186, Bureau Communautaire de Référence, Bruxelles, Belgija). Dobiveni rezultati su bili unutar preporučenih vrijednosti za pojedini standardni

referentni materijal čime je potvrđena pouzdanost rabljenih metoda i vjerodostojnost izmjerene koncentracije odnosno količine kadmija u analitima.

### 3.6.2. Određivanje količina željeza, cinka i bakra u organima i fetusu

Količine željeza, cinka i bakra u uzorcima tkiva pripremanima suhim, mokrim ili visokotlačno mikrovalnim razaranjem u sva tri pokusa su mjereni tehnikom plamene atomske apsorpcijske spektrometrije (F-AAS), u plamenu mješavine zraka i acetilena na uređaju Varian SpectrAA-300 (Springvale, Australija) s deuterijskim korektorom nespecifične apsorpcije pozadine. Instrumentalni uvjeti za analizu željeza, cinka i bakra su prikazani u tablici 8.

**Tablica 8:** Instrumentalni uvjeti za određivanje željeza, cinka i bakra tehnikom F-AAS (Varian SpectrAA-300)

Parametri	Fe	Zn	Cu
Valna duljina / nm	248,3	213,9	324,7
Širina pukotine / nm	0,2	1,0	0,5
Vrijeme integracije signala / s	3	3	3
Broj ponovljenih mjerenja	3	3	3

Prije svakog mjerenja su uzorci tkiva po potrebi razrjeđivani 1 %-tnom  $\text{HNO}_3$  kako bi izmjerene količine analita bile unutar mjernog područja. Uzorci slijepe probe su pripremani jednako kao i uzorci tkiva deioniziranom vodom umjesto uzorka tkiva.

Za sve elemente su pripremane odgovarajuće standardne otopine u koncentracijama od 0,5 do 4,7  $\mu\text{g}$  Fe/ml, 0,1-1  $\mu\text{g}$  Zn/ml i 0,1-2,1  $\mu\text{g}$  Cu/ml iz sljedećih ishodnih otopina koncentracija 1000 mg/l: *Iron standard solution*  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$  u  $\text{HNO}_3$  0,5 mol/l (Merck, Njemačka); *Zinc standard solution*  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  u  $\text{HNO}_3$  0,5 mol/l (Merck, Njemačka) i *Copper standard solution*  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  u  $\text{HNO}_3$  0,5 mol/l (Merck, Njemačka).

Pouzdanost metoda i točnost određivanja količina željeza, cinka i bakra u uzorcima tkiva je testirana mjerenjem ovih certificiranih standardnih referentnih materijala: uzoraka liofiliziranih tkiva goveđe jetre (Bovine Liver SRM 1577b, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland SAD) odnosno svinjskog bubrega (Pig Kidney CRM 186, Bureau Communautaire de Référence, Bruxelles, Belgija). Dobiveni rezultati su bili unutar preporučenih vrijednosti za pojedini standardni referentni materijal čime je

potvrđena pouzdanost rabljenih metoda i vjerodostojnost izmjerenih količina željeza, cinka odnosno bakra u analitima.

### **3.6.3. Određivanje steroidnih hormona u serumu i posteljičnom tkivu**

Koncentracije progesterona i testosterona u serumu štakorica su mjerene izravno imunokemijskom metodom IEMA (Vitros). Koncentracije progesterona i testosterona su mjerene u suspenzijama liofilizata supernatanata dobivenih nakon obrade uzoraka posteljičnog tkiva uporabom dviju metoda, IEMA (*Pokusi 1-3*) i imunokemijskom metodom ELISA (IASON) u trećem pokusu (*Pokus 3*) radi usporedbe i provjere rezultata mjerenja u uzorcima koji se ne rabe u rutinskim biokemijskim analizama.

Analize standardnom metodom IEMA su provedene u suradnom kliničkom laboratoriju uporabom standardnih reagensija (kitova) za progesteron odnosno testosteron (Ortho-Clinical Diagnostics reagents, Johnson & Johnson, Amersham, UK). Prije mjerenja u svaki uzorak liofilizata supernatanta dobivenog obradom posteljičnog tkiva je dodano 1 ml fiziološke otopine i u tako dobivenom uzorku su određene koncentracije progesterona odnosno testosterona. Prema njima su izračunate količine pojedinog steroidnog hormona u posteljici uzimajući u obzir ishodišnu masu uzorka svježeg posteljičnog tkiva.

Koncentracije steroidnih hormona progesterona i testosterona u serumu štakorica su izražene u nanogramima po mililitru, a količine progesterona odnosno testosterona u posteljici u nanogramima na gram mase svježeg tkiva. Donja granica osjetljivosti upotrijebljenih testova je bila za progesteron 0,079 ng/ml (0,25 nmol/l) i za testosteron 0,009 ng/ml (0,03 nmol/l).

Analize progesterona i testosterona metodom ELISA (*Pokus 3*) su provedene u istim uzorcima dobivenim obradom posteljičnog tkiva koji su bili analizirani i metodom IEMA u ustanovi u kojoj je ovaj rad izrađen uporabom standardnih reagensija (kitova) za progesteron i testosteron (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany) i prema uputama proizvođača. Određene su količine steroidnih hormona u posteljičnom tkivu na jednaki način kako je opisano prije. Donja granica osjetljivosti tih testova je bila za progesteron 0,045 ng/ml i za testosteron 0,083 ng/ml.

### 3.6.4. Određivanje hematokrita u štakorici i fetusu

Uzorci krvi štakorice i fetusa prikupljeni su kapilarnom elevacijom do visine stupca krvi od oko 2/3 ukupne dužine (75 mm) standardne heparinizirane kapilarne cjevčice s crvenom oznakom na vrhu (Red-Tip, Lancer, Brunswick Co., SAD). Mikrocjevčice su na jednom kraju zatvorene voskom i centrifugirane na 12000 rpm/5 min. u odgovarajućoj maloj centrifugi (Heinz Janetzki TH12, Engelsdorf-Leipzig, Njemačka). Vrijednosti hematokrita (u postocima) su očitane u pripadajućem mikročitaču s pomičnom mjernom skalom. Iako naizgled jednostavan, taj postupak je i delikatan, jer se tijekom centrifugiranja mikrocjevčica može slomiti ili rasprsnuti odnosno može se otvoriti začepljeni kraj mikrocjevčice pri čemu se uzorak krvi izgubi. Od svake pokusne životinje smo imali barem jedan od dva usporedno uzeta uzorka krvi, a ako su oba ostala sačuvana u obzir je uzeta njihova srednje vrijednost.

### 3.7. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija i/ili kao medijan s rasponom najmanje i najveće vrijednosti. Prikazivanje rezultata i daljnja statistička obrada unutar svakog pokusa je ovisila o nalazu testiranja hipoteze o normalnoj distribuciji podataka Shapiro-Wilksovim testom i analize homogenosti varijance Leveneovim testom.

Ako su brojčani podaci bili normalno distribuirani, prikazani su kao aritmetička sredina i standardna devijacija i kao medijan s rasponom, a razlike između pokusnih skupina (izložena *vs.* pripadajuća kontrola) su analizirane Studentovim *t*-testom. Brojčani podaci za pojedini biološki pokazatelj koji nisu bili normalno distribuirani su prikazani samo kao medijan i raspon, a za analizu razlika takvih vrijednosti između pokusnih skupina (izložena *vs.* pripadajuća kontrola) smo se koristili ovim neparametrijskim testovima: *t*-testom s korekcijom po Satterthwaiteu za nejednake varijance, Wilcoxon *rank-sum* testom ili Wilcoxon-Mann-Whitneyev *U*-testom. Razina značajnosti prilikom tih analiza je bila 0,05.

Naknadne (*post hoc*) usporedbe prirasta tjelesnih težina štakorica te unosa krmiva i tekućine na dan između prvog i drugog dijela skotnosti/trajanja pokusa su analizirane dvosmjernom analizom varijance (*two-way ANOVA*) za ponovljena mjerenja, gdje su prirast tjelesne mase, unos krmiva na dan i unos tekućine na dan upotrijebljeni kao zavisne varijable, a nezavisne varijable (prediktori) su bili izloženost kadmiju i razdoblje skotnosti (prva polovica skotnosti odnosno druga polovica skotnosti).



Naknadne (*post hoc*) usporedbe tjelesnih masa, prirasta tjelesnih masa, masa svježih organa, unosa krmiva na dan, unosa tekućine na dan, koncentracija kadmija u krvi i količina ispitivanih elemenata u tragovima, kadmija, željeza, cinka i bakra u uzorcima organa i fetusu su analizirane dvosmjernom analizom varijance (*two-way ANOVA*) s Tukeyevim HSD *post hoc* testom na navedene parametre kao zavisne varijable. Nezavisne varijable su bili učinak izloženosti kadmiju i učinak skotnosti, pri čemu je također testirana i statistička interakcija tih nezavisnih varijabli. Na tablicama su označeni simbolom brojčani podaci u kojima je nađen značajan utjecaj jedne od testiranih nezavisnih varijabli, utjecaj izloženosti kadmiju i/ili utjecaja skotnosti. U opisima ispod tablica je navedeno radi li se o utjecaju jedne ili obje testirane nezavisne varijable, a detaljni opisi rezultata dobiveni dvosmjernim analizama varijance (*two-way ANOVA*) su navedeni u tekstu poglavlja Rezultati, po pojedinačnim pokazateljima (s navođenjem pripadajućih vrijednosti F i P). Razina značajnosti prilikom tih analiza je bila 0,001.

Za cjelokupnu statističku obradu podataka u ovom istraživanju rabljen je licencirani računalni program *STATA/SE 11,1* for Windows (StataCorp LP, College STATION, Teksas, SAD) uz pomoć i konzultacije znanstvenog istraživača u ustanovi sa stručnim znanjem i iskustvom u biostatističkim obradama podataka.

## 4. REZULTATI

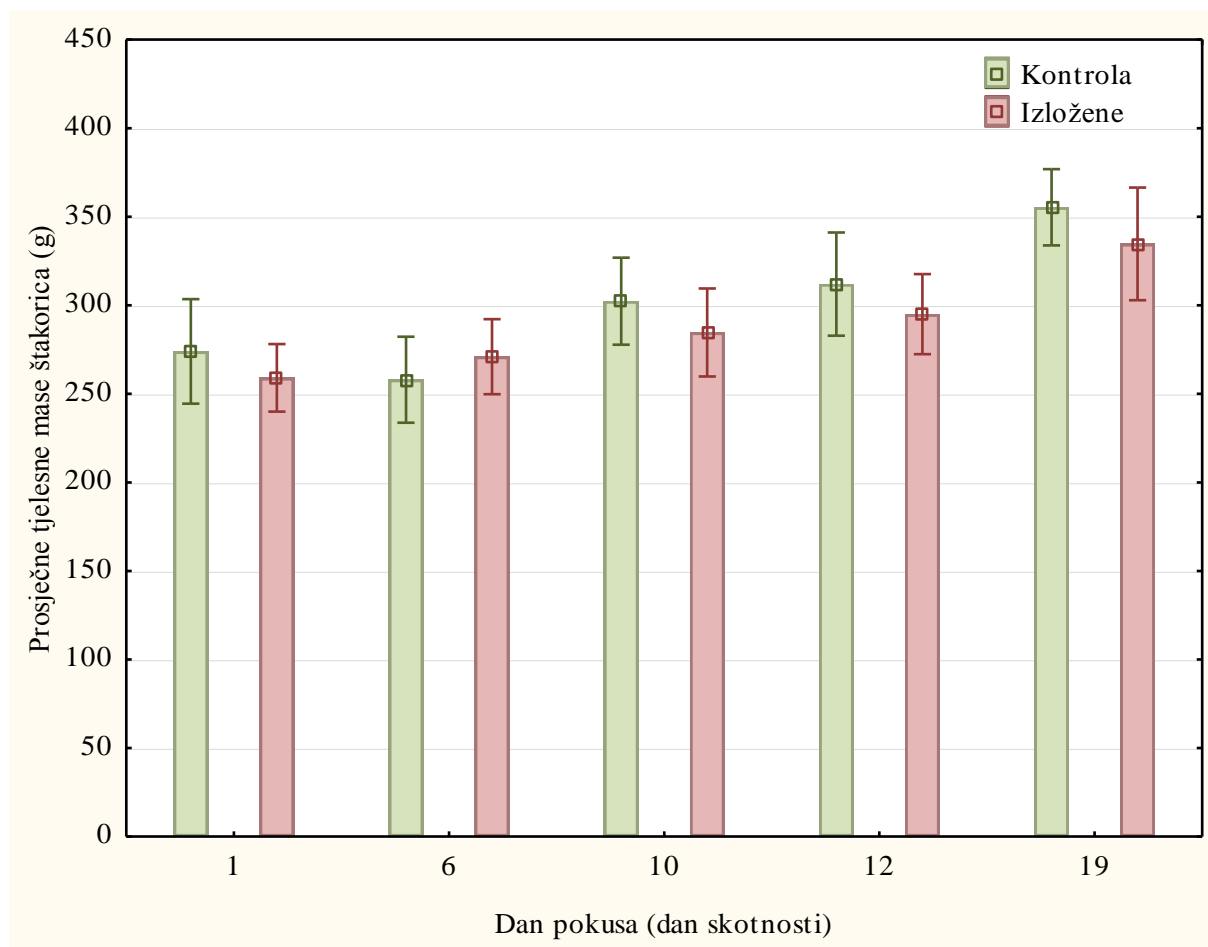
### 4.1. Opći pokazatelji zdravlja štakorica

#### 4.1.1. Tjelesne mase, mase svježih organa i mase fetusa

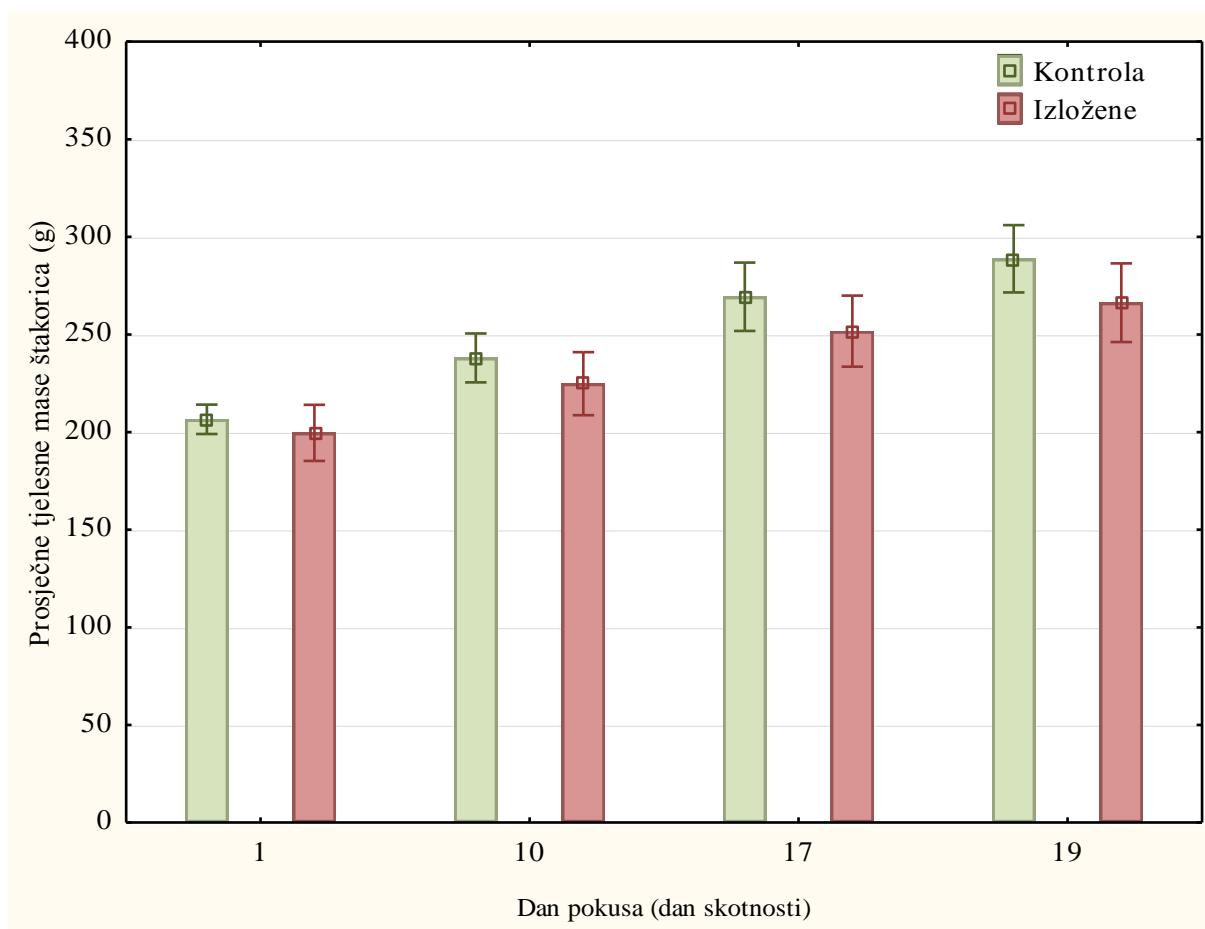
Peroralna izloženost kadmiju u vodi za piće (50 mg Cd/l) u skotnih štakorica izloženih 19 odnosno 20 dana tijekom skotnosti i u neskotnih štakorica izloženih kadmiju pod jednakim uvjetima nije izazvala opće toksične učinke u pokusnih životinja. Sve štakorice su bile dobrog općeg stanja, jele su krmivo i pile tekućinu za napajanje postavljene na kaveze, nije bilo zastoja u prirastu tjelesnih masa i nije bilo ugibanja životinja. Tijekom trajanja svih pokusa nije bilo promjena u prosječnim tjelesnim masama izloženih štakorica u odnosu na pripadajuće kontrole tijekom pojedinog pokusa kako je prikazano grafički (slike 4-1, 4-2 i 4-3).

Rezultati u tablici 9. pokazuju da su na dan završetka peroralne izloženosti kadmiju jedino u *Pokusu 2* u izloženih skotnih štakorica bile snižene tjelesne mase, a u *Pokusu 3* povišene mase bubrega. Osim tih izuzetaka 19. odnosno 20. dana peroralne izloženosti kadmiju nije bilo učinaka na tjelesne mase izloženih skotnih i neskotnih štakorica kao ni na svježe mase jetre i bubrega u odnosu na ogovarajuće vrijednosti u kontrolnim skupinama. Također nije bilo promjena u svježim masama posteljica i cijelih fetusa 19. dana (*Pokusi 1* i *2*) ili 20. dana skotnosti/ trajanja maternalne izloženosti kadmiju (*Pokus 3*).

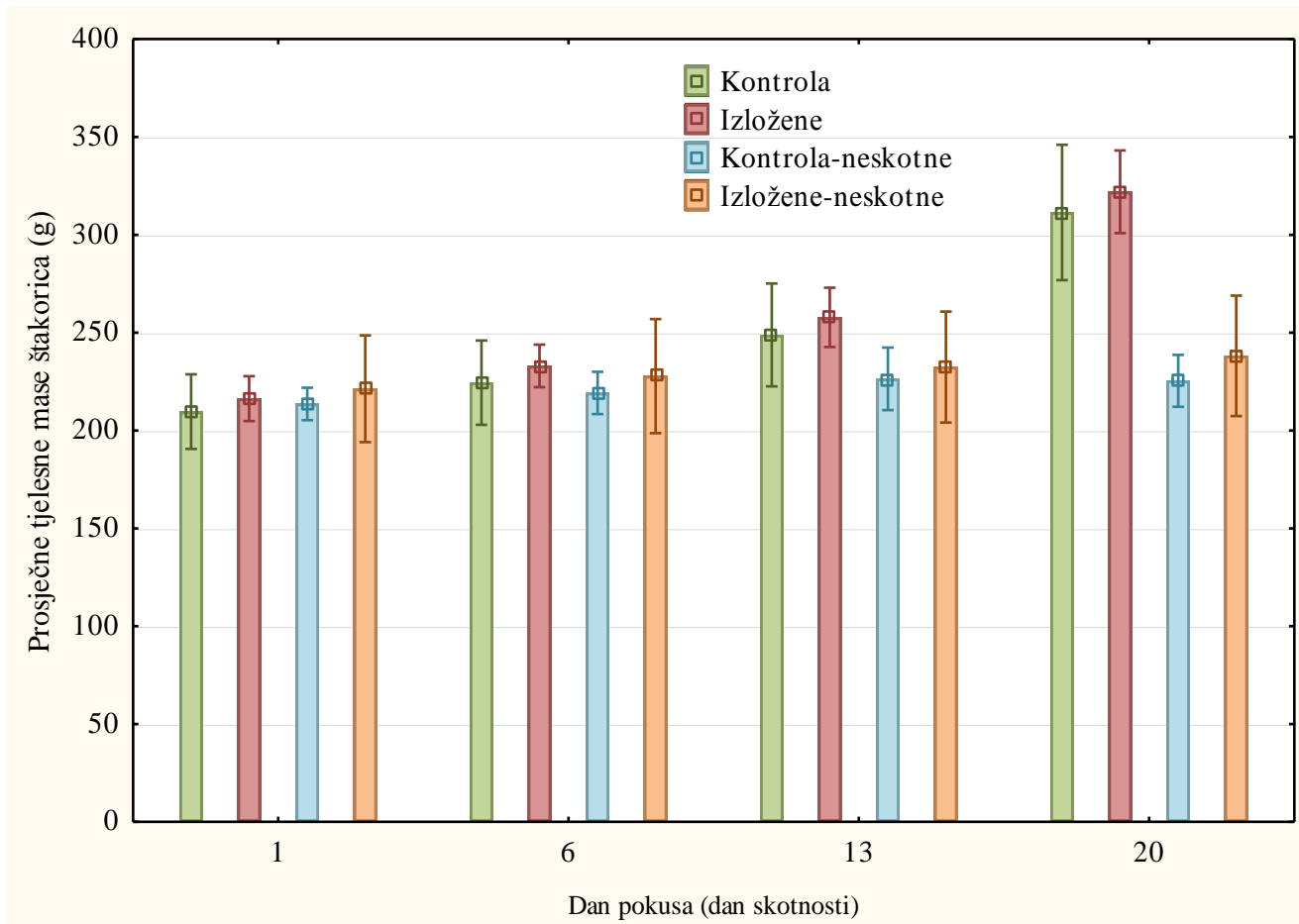
Nakon naknadno provedene dvosmjerne analize varijance (*two-way ANOVA*) i Tukeyevog *post hoc* HSD testa, 20. dana pokusa (*Pokus 3*) je nađen statistički značajan učinak skotnosti bez obzira na izloženost kadmiju, na povećanja tjelesnih masa štakorica ( $F_{\text{Učinak skotnosti}}=78,5$ ;  $P<0,001$ ) i svježih masa jetre ( $F_{\text{Učinak skotnosti}}=110$ ;  $P<0,001$ ) i bubrega ( $F_{\text{Učinak skotnosti}}=7,64$ ;  $P<0,009$ ) (tablica 9, *Pokus 3*).



**Slika 4-1.** Prosječne tjelesne mase skotnih štakorica (g) tijekom peroralnog izlaganja kadmiju (50 mg Cd/l u obliku klorida) u vodi za piće od 1. do 19. dana skotnosti/trajanja pokusa izmjerene 1., 6., 10., 12. i 19. dana pokusa u *Pokusu 1* ( $N=3$  za svaku skupinu, svaki dan mjerenja).



**Slika 4-2.** Prosječne tjelesne mase skotnih štakorica (g) tijekom peroralnog izlaganja kadmiju (50 mg Cd/l u obliku klorida) u vodi za piće od 1. do 19. dana skotnosti/trajanja pokusa izmjerene 1., 10., 17. i 19. dana pokusa u *Pokusu 2* ( $N=9$  za kontrole,  $N=11$  za izložene, svaki dan mjerenja).



**Slika 4-3.** Prosječne tjelesne mase skotnih štakorica (g) tijekom peroralnog izlaganja kadmiju (50 mg Cd/l u obliku klorida) u vodi za piće od 1. do 20. dana skotnosti/trajanja pokusa i u neskotnih štakorica izloženih pod jednakim uvjetima izloženosti, izmjerene 1., 6., 13. i 20. dan pokusa u *Pokusu 3* ( $N=14$  za kontrole,  $N=10$  za izložene,  $N=5$  za neskotne kontrole,  $N=15$  za neskotne izložene, svaki dan mjerenja).

**Tablica 9.** Prosječne tjelesne mase i mase svježih organa štakorice, jetre i bubrega te posteljice i fetusa posljednjeg dana peroralnog izlaganja kadmiju (50 mg Cd/l u obliku klorida) u vodi za piće u skotnih štakorica izloženih od 1. do 19. odnosno 20. dana skotnosti i u neskotnih štakorica izloženih pod jednakim uvjetima tijekom 20 dana

Pokus/ skupina	N	Tjelesna masa (g)	Mase svježih organa (g)			
			Jetra	Bubreg	Posteljica	Fetus
<i>Pokus 1</i>						
Kontrola	3	355±21,5	13,5±0,661	0,963±0,194	0,403±0,039	1,21±0,749
Izložene	3	335±31,8	11,8±1,46	0,845±0,053	0,405±0,061	1,46±0,792
<i>Pokus 2</i>						
Kontrola	9	289±17,2	11,5±0,696	0,797±0,066	0,389±0,043	1,34 (1,26-2,15)
Izložene	11	266±20,1*	10,2±1,08	0,798±0,085	0,418±0,055	1,37 (1,30-1,55)
<i>Pokus 3</i>						
Kontrola	14	311±34,6 <sup>§</sup>	12,3±1,66 <sup>§</sup>	0,762±0,092 <sup>§</sup>	0,402±0,033	2,16±0,113
Izložene	10	322±21,1 <sup>§</sup>	12,4±1,12 <sup>§</sup>	0,853±0,089* <sup>§</sup>	0,411±0,031	2,17±0,165
Kontrola – neskotne	5	225±13,3	7,56±1,03	0,694±0,081	–	–
Izložene – neskotne	15	238±30,8	7,67±1,29	0,730±0,127	–	–

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija za normalno distribuirane podatke i samo kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi za nenormalno distribuirane podatke.

\*Statistički značajna razlika ( $P<0,05$ ) između izložene i kontrolne skupine testirana Studentovim *t*-testom za normalno distribuirane podatke.

<sup>§</sup>Statistički značajan učinak skotnosti ( $P<0,05$ ) testiran dvosmjernom analizom varijance (ANOVA) i Tukeyevim *post hoc* HSD testom.

#### 4.1.2. Prirast tjelesnih masa štakorica i prosječan unos krmiva i tekućine za napajanje

Prirast tjelesnih masa štakorica, prosječne vrijednosti unosa krmiva i tekućine za napajanje na dan u skotnih i neskotnih štakorica u prvoj i drugoj polovici trajanja pokusa od po 10 dana (DP1-10, DP 11-19/20) su prikazani u tablici 10. U *Pokusu 2* je nađeno da su prirast tjelesne mase u drugom dijelu skotnosti i prosječan unos krmiva na dan tijekom cijelog razdoblja skotnosti bili značajno niži u izloženih skotnih štakorica nego u kontrola. U sva tri pokusa (*Pokusi 1-3*) je prosječan unos tekućine za napajanje na dan bio značajno niži u svih izloženih štakorica u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine i to je bilo jače izraženo u drugom polovici trajanja svakog pokusa.

Naknadno provedenom dvosmjernom analizom varijance (*two-way ANOVA*) i Tukeyevim *post hoc* HSD testom 20. dana pokusa (*Pokus 3*) je nađen statistički značajan učinak skotnosti na povećanja prirasta tjelesnih masa i prosječnog unosa krmiva na dan tijekom prve i druge polovice pokusa te prosječnog unosa tekućine za napajanje na dan u drugoj polovici pokusa, bez obzira na izloženost kadmiju. Nije nađen učinak izloženosti kadmija na prirast tjelesnih masa i prosječan unos krmiva na dan, ali je nađen učinak kadmija na sniženje prosječnog unosa tekućine za napajanje na dan za 42% ( $F_{\text{Učinak kadmija}}=16,2$ ;  $P<0,001$ ) u obje polovice trajanja pokusa.

Dvosmjernom analizom varijance (*two-way ANOVA*) za ponovljena mjerenja je potvrđen statistički značajan učinak razdoblja skotnosti, tj. jedne od polovica cijelog razdoblja skotnosti/trajanja pokusa na prirast tjelesnih masa štakorica ( $F_{\text{Učinak razdoblja skotnosti}}=84,5$ ;  $P<0,001$ ), prosječan unos krmiva na dan ( $F_{\text{Učinak razdoblja skotnosti}}=430$ ;  $P<0,001$ ) i prosječan unos tekućine za napajanje na dan ( $F_{\text{Učinak razdoblja skotnosti}}=30,6$ ;  $P<0,001$ ). Nađeno je da je tijekom druge polovice razdoblja skotnosti/trajanja pokusa prirast tjelesnih masa štakorica bio 1,6 puta veći, prosječan unos krmiva na dan 1,2 puta veći i prosječan unos tekućine za napajanje na dan 1,3 puta veći u odnosu na prvu polovicu pokusa u svih štakorica neovisno o izloženosti kadmiju (tablica 10, *Pokus 3*).

**Tablica 10.** Utjecaj peroralne izloženosti kadmiju u vodi za piće (50 mg Cd/l u obliku klorida) na prirast tjelesne mase, prosječan unos krmiva i tekućine za napajanje na dan u prvoj i drugoj polovici pokusa u skotnih štakorica izloženih od 1. do 19. odnosno 20. dana skotnosti i u neskotnih štakorica izloženih pod jednakim uvjetima tijekom 20 dana

Pokus/ skupina	N	Prirast tjelesne mase (g)		Prosječan unos krmiva (g/dan)		Prosječan unos tekućine za napajanje (ml/dan)	
		DP 1-10	DP 11-19/20	DP 1-10	DP 11-19/20	DP 1-10	DP 11-19/20
<i>Pokus 1</i>							
Kontrola	3	28,3±6,51	53,0±3,61	12,5±1,56	22,1±1,42	44,1±6,92	58,3±8,00
Izložene	3	25,7±8,96	50,0±9,00	11,4±1,05	20,4±1,58	34,8±2,12	42,8±2,62*
<i>Pokus 2</i>							
Kontrola	9	31,4±9,36	50,8±8,14	16,7±1,80	19,8±2,16	51,2±20,1	71,2±24,8
Izložene	11	25,2±6,84	41,5±9,96*	14,9±1,44*	17,5±1,64*	27,8±2,99* <sup>1</sup>	27,6±3,38* <sup>1</sup>
<i>Pokus 3</i>							
Kontrola	14	39,2±8,96 <sup>§</sup>	62,6±11,2 <sup>§</sup>	19,9±2,59 <sup>§</sup>	24,7±2,50 <sup>§</sup>	59,7±17,2	77,3±14,9 <sup>§</sup>
Izložene	10	41,5±8,32 <sup>§</sup>	64,2±10,8 <sup>§</sup>	20,0±1,46 <sup>§</sup>	24,6±1,91 <sup>§</sup>	34,3±4,80*	44,9±4,80* <sup>§</sup>
Kontrola – neskotne	5	12,8±8,79	3,67±1,53	16,1±1,89	16,5±1,33	55,5±14,6	61,0±11,8
Izložene – neskotne	15	13,8±9,19	7,83±4,47	16,3±2,40	15,8±2,44	35,0±6,09*	38,0±6,35*

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija.

DP - dan pokusa; DP 1-10 – prva polovica pokusa; DP 11-19/20 – druga polovica pokusa (*Pokusi 1 i 2* su trajali 19 dana, a *Pokus 3* je trajao 20 dana).

\*Statistički značajna razlika ( $P<0,05$ ) između izložene i kontrolne skupine testirana Studentovim *t*-testom za normalno distribuirane podatke.

\*<sup>1</sup>Statistički značajna razlika ( $P<0,05$ ) između izložene i kontrolne skupine testirana Studentovim *t*-testom s korekcijom po Satterthwaiteu za nejednake varijance.

<sup>§</sup>Statistički značajan učinak skotnosti ( $P<0,05$ ) testiran dvosmjernom analizom varijance (ANOVA) i Tukeyevim *post hoc* HSD testom.



#### **4.1.3. Broj žutih tijela u jajnicima te zametaka i fetusa u maternici**

U tablici 11. su prikazani medijani s rasponima vrijednosti ukupnog broja žutih tijela u jajnicima te ukupnih brojeva zametaka, rano i kasno odbačenih (resorbiranih) zametaka, uginulih fetusa i živih fetusa u oba roga maternice 19. odnosno 20. dana skotnosti/trajanja pokusa.

Nije bilo učinaka izloženosti kadmiju ni u jednom od provedenih pokusa (*Pokusi 1-3*) na broj žutih tijela u jajnicima, ukupan broj zametaka te broj rano i kasno odbačenih zametaka. Broj rano odbačenih zametaka nije bio veći od 2, broj kasno odbačenih zametaka nije bio veći od 1 i broj uginulih fetusa nije bio veći od 1 (*Pokusi 1-3*). Ukupan broj zametaka odgovarao je ukupnom broju živih fetusa i ukupnom zbroju žutih tijela u oba jajnika svake štakorice. Nije bilo razlika između izloženih i kontrolnih štakorica.

**Tablica 11.** Prosječne vrijednosti ukupnih brojeva žutih tijela u jajnicima, svih zametaka, rano i kasno odbačenih (resorbiranih) zametaka te uginulih i živih fetusa u oba roga maternice štakorica posljednjeg dana peroralnog izlaganja kadmiju (50 mg Cd/l u obliku klorida) u vodi za piće u skotnih štakorica izloženih od 1. do 19. odnosno 20. dana skotnosti

Pokus/ skupina	N	Broj žutih tijela u jajniku		Ukupan broj zametaka	Broj rano odbačenih zametaka	Broj kasno odbačenih zametaka	Broj uginulih fetusa	Ukupan broj živih fetusa
		Desni jajnik	Lijevi jajnik					
<i>Pokus 1</i>								
Kontrola	3	6 (4-7)	9 (8-10)	12 (11-19)	0 (0-2)	0	0	12 (11-17)
Izložene	3	<sup>a</sup> 5 (4-5)	<sup>a</sup> 6 (4-8)	12 (11-13)	1 (1-1)	0	0	11 (11-12)
<i>Pokus 2</i>								
Kontrola	9	5 (0-8)	5 (2-9)	9 (4-12)	0 (0-2)	0	1 (1-1)	9 (4-11)
Izložene	11	6 (3-8)	5 (0-8)	9 (2-11)	1 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-1)	8 (2-11)
<i>Pokus 3</i>								
Kontrola	14	8 (5-10)	6 (2-8)	12 (4-15)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-1)	12 (4-15)
Izložene	10	7 (5-12)	8 (3-10)	11 (8-16)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-1)	11 (8-16)

Rezultati su prikazani kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi.

<sup>a</sup>N=2.

## 4.2. Kadmij i esencijalni mikroelementi u štakorici i fetusu

### 4.2.1. Količine kadmija u unutrašnjim organima štakorica, posteljici i fetusu

Rezultati analiza koncentracija kadmija u krvi i količina kadmija u unutrašnjim organima skotnih i neskotnih štakorica, jetri i bubregu te posteljici i fetusu posljednjeg dana peroralnog izlaganja kadmiju (50 mg Cd/l u obliku klorida) u vodi za piće su prikazani u tablici 12.

U sva tri pokusa (*Pokusi 1-3*), peroralna izloženost kadmiju tijekom 19 odnosno 20 dana u skotnih i 20 dana u neskotnih štakorica je bila povezana s višestruko (do 100 puta) većim koncentracijama kadmija u krvi svih izloženih štakorica u odnosu na kontrole. U jetri i bubregu izloženih skotnih i neskotnih štakorica nađene su i do nekoliko stotina puta veće količine kadmija u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrijednosti. Količine kadmija u posteljici izloženih štakorica su bile do nekoliko tisuća puta veće u odnosu na kontrolne vrijednosti. U fetusu izloženih majki nađene su također statistički značajno veće količine kadmija od kontrolnih vrijednosti.

Nakon provedene dvosmjerne analize varijance (*two-way ANOVA*) i Tukeyevog *post hoc* HSD testa u *Pokusu 3* je nađen učinak kadmija na povišene koncentracije kadmija u krvi svih izloženih štakorica ( $F_{\text{Učinak kadmija}}=508$ ;  $P<0,001$ ). Također je nađen učinak skotnosti na povišene koncentracije kadmija u krvi u svih štakorica bez obzira na izloženost kadmiju ( $F_{\text{Učinak skotnosti}}=27,1$ ;  $P<0,001$ ). Značajna interakcija učinaka kadmija i skotnosti pokazuje da je povećana koncentracija kadmija u krvi bila izraženija u izloženih skotnih nego u izloženih neskotnih štakorica ( $F_{\text{Kadmij} \times \text{skotnost}}=26,6$ ;  $P<0,001$ ). Nađen je učinak kadmija na povećanja količina kadmija u jetri ( $F_{\text{Učinak kadmija}}=6844$ ;  $P<0,001$ ) i bubregu ( $F_{\text{Učinak kadmija}}=7745$ ;  $P<0,001$ ). Značajne interakcije učinaka kadmija i skotnosti na povećanja količina kadmija u jetri ( $F_{\text{Kadmij} \times \text{skotnost}}=22,0$ ;  $P<0,001$ ) i u bubregu ( $F_{\text{Kadmij} \times \text{skotnost}}=7,48$ ;  $P<0,009$ ) pokazuju da je izloženost kadmiju jače utjecala na povećanje količina kadmija u jetri i bubregu izloženih skotnih nego izloženih neskotnih štakorica (tablica 12, *Pokus 3*).

**Tablica 12.** Koncentracija kadmija u krvi i količine kadmija u unutrašnjim organima štakorice, jetri i bubregu te posteljici i fetusu štakorica posljednjeg dana peroralnog izlaganja kadmiju (50 mg Cd/l u obliku klorida) u vodi za piće u skotnih štakorica izloženih od 1. do 19. odnosno 20. dana skotnosti i u neskotnih štakorica izloženih pod jednakim uvjetima tijekom 20 dana

Koncentracija kadmija u krvi i količine kadmija u tkivima						
Pokus/ skupina	N	Krv (ng/ml)	Jetra	Bubreg (ng/g mase svježeg tkiva)	Posteljica	Fetus
<i>Pokus 1</i>						
Kontrola	3	<sup>#a</sup> 0,350±0,071	31,0±14,1	53,1±10,3	1,80±0,529	1,47±1,17
Izložene	3	<sup>#</sup> 15,3±11,9	2517±454*	4680±850*	248±72.3*	2,00±0,755
<i>Pokus 2</i>						
Kontrola	9	0,165±0,124 0,141 (0,031-0,391)	60,0±73,6 17,9 (14,3-212)	45,5 (25,0-250)	4,73 (0,784-58,9)	0,953 (0,413-7,15)
Izložene	11	15,5±2,55 15,7* <sup>1</sup> (11,8-19,6)	4496±1408 3997** (2518-6758)	4490** (2882-7159)	377** (320-589)	1,57** (1,26-2,44)
<i>Pokus 3</i>						
Kontrola	14	0,277±0,178 0,320 <sup>§</sup> (0,000-0,515)	6,19 (3,07-8,66)	15,3 (12,3-35,4)	<sup>b</sup> 0,209 (0,000-1,07)	0,191 (0,032-0,982)
Izložene	10	18,2±2,47 18,3* <sup>1§</sup> (14,1-22,6)	4478** (3912-9082)	8357** (6908-9241)	434** (363-483)	0,726** (0,417-2,21)
Kontrola – neskotne	5	0,246±0,128 0,176 (0,151-0,452)	8,61±1,47 9,28 (6,42-10,1)	18,0 (17,7-27,8)	–	–
Izložene – neskotne	15	11,5±2,63 12,5** (6,99-15,0)	3439±404 3390** (2785-4121)	6247** (5043-9228)	–	–

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija i kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi za normalno distribuirane podatke te samo kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi za nenormalno distribuirane podatke. <sup>a</sup>N=2, <sup>b</sup>N=13.

<sup>#</sup>U *Pokusu 1* koncentracija kadmija u krvi je mjerena nakon pripreme uzoraka kao i za ostala tkiva i radi toga su vrijednosti izražene kao količine u ng/g mase svježeg tkiva.

\*Statistički značajna razlika (P<0,05) između izložene i kontrolne skupine testirana Studentovim *t*-testom za normalno distribuirane podatke.

\*\*Statistički značajna razlika (P<0,05) između izložene i kontrolne skupine testirana Wilcoxon-Mann-Whitney testom za nenormalno distribuirane podatke.

\*<sup>1</sup>Statistički značajna razlika (P<0,05) između izložene i kontrolne skupine testirana Studentovim *t*-testom s korekcijom po Satterthwaiteu za nejednake varijance.

<sup>§</sup>Statistički značajan učinak skotnosti (P<0,05) testiran dvosmjernom analizom varijance (ANOVA) i Tukeyevim *post hoc* HSD testom.

#### 4.2.2. Količine željeza u unutrašnjim organima štakorica, posteljici i fetusu

Tablica 13. prikazuje nalaze količina željeza u unutrašnjim organima skotnih i neskotnih štakorica, jetri i bubregu te posteljici i fetusu posljednjeg dana izlaganja kadmiju.

U unutrašnjim organima izloženih skotnih štakorica, u jetri (*Pokus 3*) i u bubregu (*Pokusi 2 i 3*), nađene su značajno manje količine željeza u odnosu na kontrolne vrijednosti. U *Pokusima 2 i 3* su također nađene statistički značajno manje količine željeza u fetusu, a nije bilo razlika u količini željeza u posteljici.

Nakon provedene dvosmjerne analize varijance (*two-way ANOVA*) i Tukeyevog *post hoc* HSD testa u *Pokusu 3* je nađen je učinak kadmija na sniženja količina željeza u jetri ( $F_{\text{Učinak kadmija}}=5,51$ ;  $P<0,024$ ) i u bubregu ( $F_{\text{Učinak kadmija}}=17,9$ ;  $P<0,001$ ). Također je nađen i učinak skotnosti na sniženja količina željeza u jetri ( $F_{\text{Učinak skotnosti}}=107$ ;  $P<0,001$ ) i u bubregu ( $F_{\text{Učinak skotnosti}}=41,1$ ;  $P<0,001$ ). Značajna interakcija učinaka kadmija i skotnosti pokazuje da je izloženost kadmiju jače utjecala na sniženja količina željeza u jetri ( $F_{\text{Kadmij} \times \text{skotnost}}=8,59$ ;  $P<0,006$ ) i bubregu ( $F_{\text{Kadmij} \times \text{skotnost}}=5,52$ ;  $P<0,024$ ) u izloženih skotnih nego u izloženih neskotnih štakorica (tablica 13, *Pokus 3*).

##### 4.2.2.1. Hematokrit u štakoricama i fetusima

Vrijednosti hematokrita u skotnih štakorica, fetusa i u neskotnih štakorica posljednjeg dana izlaganja kadmiju su prikazane u tablici 14. Peroralna izloženost kadmiju tijekom 19 odnosno 20 dana skotnosti nije utjecala na vrijednosti hematokrita u štakorica. U *Pokusu 2* je nađen viši hematokrit u fetusima izloženih štakorica u odnosu na vrijednosti u neizloženih, kontrolnih štakorica, no u *Pokusu 3* nije potvrđena ta razlika. U neskotnih štakorica nije bilo razlika u vrijednostima hematokrita.

Wilcoxon-Mann-Whitneyevim testom je utvrđen učinak skotnosti na sniženje prosječnog hematokrita u štakorica bez obzira na izloženost kadmiju (tablica 14, *Pokus 3*).

**Tablica 13.** Količine željeza u unutrašnjim organima štakorice, jetri i bubregu te posteljici i fetusu štakorica posljednjeg dana peroralnog izlaganja kadmiju (50 mg Cd/l u obliku klorida) u vodi za piće u skotnih štakorica izloženih od 1. do 19. odnosno 20. dana skotnosti i u neskotnih štakorica izloženih pod jednakim uvjetima tijekom 20 dana

		Količine željeza			
Pokus/ skupina	N	Jetra	Bubreg (µg/g mase svježeg tkiva)	Posteljica	Fetus
<u>Pokus 1</u>					
Kontrola	3	167±34,4	98,3±25,1	95,0±13,0	58,0±8,89
Izložene	3	153±21,8	87,7±9,50	89,7±26,1	47,3±8,50
<u>Pokus 2</u>					
Kontrola	9	160 (130-620)	101±12.5 103 (78,4-118)	125±18,5 124 (85,6-153)	66,0±9,38 62,8 (52,1-83,7)
Izložene	11	127 (94,5-602)	<sup>a</sup> 67,1±12,6 70,3* (48,7-86,8)	123±19,7 126 (86,3-152)	52,9±10,5 52,2* (32,1-66,4)
<u>Pokus 3</u>					
Kontrola	14	188±57,6 187 <sup>§</sup> (114-313)	95,9±13,6 97,1 <sup>§</sup> (68,6-117)	107±12,1 107 (91,3-133)	61,1 (44,0-67,7)
Izložene	10	98,8±14,7 98,8* <sup>1§</sup> (70,9-117)	60,3±8,65 58,5* <sup>§</sup> (44,8-74,6)	102±13.5 105 (70,6-116)	44,6** (33,0-55,5)
Kontrola – neskotne	5	348 (157-380)	117 (98,1-205)	–	–
Izložene – neskotne	15	320 (257-398)	108 (81,5-239)	–	–

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija i kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi za normalno distribuirane podatke te samo kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi za nenormalno distribuirane podatke. <sup>a</sup>N=8.

\*Statistički značajna razlika ( $P<0,05$ ) između izložene i kontrolne skupine testirana Studentovim *t*-testom za normalno distribuirane podatke.

\*\*Statistički značajna razlika ( $P<0,05$ ) između izložene i kontrolne skupine testirana Wilcoxon-Mann-Whitney testom za nenormalno distribuirane podatke.

<sup>1</sup>Statistički značajna razlika ( $P<0,05$ ) između izložene i kontrolne skupine testirana Studentovim *t*-testom s korekcijom po Satterthwaiteu za nejednake varijance.

<sup>§</sup>Statistički značajan učinak skotnosti ( $P<0,05$ ) testiran dvosmjernom analizom varijance (ANOVA) i Tukeyevim *post hoc* HSD testom.

**Tablica 14.** Vrijednosti hematokrita u skotnih štakorica i njihovih fetusa određeni posljednjeg dana izlaganja kadmiju (50 mg Cd/l u obliku klorida) u vodi za piće u skotnih štakorica izloženih od 1. do 19. odnosno 20. dana skotnosti i u neskotnih štakorica izloženih pod jednakim uvjetima tijekom 20 dana

Hematokrit (%)				
Pokus/ skupina	N	Štakorice	N	Fetusi
<u>Pokus 2</u>				
Kontrola	8	36,1±4,32	9	32,3±4,42
		37,5 (28,0-40,0)		32,0 (25,5-38,0)
Izložene	11	36,1±1,96	11	36,0±2,39
		36,5 (33,5-39,5)		36,0* (25,5-39,0)
<u>Pokus 3</u>				
Kontrola	12	37,8 <sup>§</sup> (33,0-40,0)	8	45,5 (31,0-53,0)
Izložene	10	35,5 <sup>§</sup> (26,5-39,5)	10	41,0 (33,5-50,0)
Kontrola –neskotne	4	39,5 (36,0-44,0)		—
Izložene –neskotne	14	43,3 (21,5-48,5)		—

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija i kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi za normalno distribuirane podatke te samo kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi za nenormalno distribuirane podatke.

\*Statistički značajna razlika ( $P < 0,05$ ) između izložene i kontrolne skupine testirana Studentovim  $t$ -testom.

<sup>§</sup>Statistički značajan učinak skotnosti ( $P < 0,05$ ) testiran Wilcoxon-Mann-Whitneyevim testom.

#### 4.2.3. Količine cinka u unutrašnjim organima štakorica, posteljici i fetusu

Na tablici 15. su prikazani nalazi količina cinka u unutrašnjim organima skotnih i neskotnih štakorica, jetri i bubregu te posteljici i fetusu posljednjeg dana izlaganja kadmiju.

U *Pokusu 3* su količine cinka bile više u jetri izloženih skotnih i neskotnih štakorica u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine, a u izloženih skotnih štakorica su bile niže količine cinka u bubregu. U izloženih štakorica su količine cinka bile niže u posteljici (*Pokusi 1-3*) i u fetusu (*Pokusi 1 i 2*) u odnosu na vrijednosti u kontrolnim štakoricama.

Dvosmjernom analizom varijance (*two-way ANOVA*) i Tukeyevim *post hoc* HSD testom u *Pokusu 3* je nađen učinak kadmija na povišenje količine cinka u jetri ( $F_{\text{Učinak kadmija}}=29,4$ ;  $P<0,001$ ) i sniženje količine cinka u bubregu ( $F_{\text{Učinak kadmija}}=5,10$ ;  $P=0,029$ ). Značajna interakcija učinaka kadmija i skotnosti pokazuje da je izloženost kadmiju jače utjecala na sniženje količine cinka u bubregu izloženih skotnih nego izloženih neskotnih štakorica ( $F_{\text{Kadmij} \times \text{skotnost}}=9,43$ ;  $P<0,004$ ) (tablica 15, *Pokus 3*).

#### 4.2.4. Količine bakra u unutrašnjim organima štakorica, posteljici i fetusu

Količine bakra u unutrašnjim organima štakorica, jetri i bubregu te posteljici i fetusu posljednjeg dana pokusa su prikazane u tablici 16. Peroralna izloženost kadmiju tijekom 19 odnosno 20 dana skotnosti odnosno 20 dana u neskotnih štakorica nije utjecala na količine bakra u jetri, posteljici i fetusu (*Pokusi 1-3*). U bubregu izloženih skotnih štakorica je nađena manja količina bakra nego u kontrolnih štakorica (*Pokus 3*).

Nakon provedene dvosmjerne analize varijance (*two-way ANOVA*) i Tukeyevog *post hoc* HSD testa u *Pokusu 3* je nađen učinak skotnosti na smanjenje količine bakra u jetri ( $F_{\text{Učinak skotnosti}}=28,9$ ;  $P<0,001$ ) i povećanje količine bakra u bubregu ( $F_{\text{Učinak skotnosti}}=39,2$ ;  $P<0,001$ ). Značajna interakcija učinaka kadmija i skotnosti u bubregu pokazuje da je izloženost kadmiju jače utjecala na smanjenje količine bakra u bubregu izloženih skotnih nego izloženih neskotnih štakorica ( $F_{\text{Kadmij} \times \text{skotnost}}=6,33$ ;  $P<0,016$ ) (tablica 13, *Pokus 3*).



**Tablica 15.** Količine cinka u unutrašnjim organima štakorice, jetri i bubregu te posteljici i fetusu posljednjeg dana peroralnog izlaganja kadmiju (50 mg Cd/l u obliku klorida) u vodi za piće u skotnih štakorica izloženih od 1. do 19. odnosno 20. dana skotnosti i u neskotnih štakorica izloženih pod jednakim uvjetima tijekom 20 dana

		Količine cinka			
Pokus/ skupina	N	Jetra	Bubreg	Posteljica	Fetus
		(µg/g mase svježeg tkiva)			
<i>Pokus 1</i>					
Kontrola	3	<sup>a</sup> 18,8±5,33	18,4±1,37	11,9±0,751	11,3±2,02
Izložene	3	23,2±1,30	17,0±1,44	9,97±0,572*	6,44±1,65*
<i>Pokus 2</i>					
Kontrola	9	32,9 (29,4-33,9)	27,0 (23,4-30,9)	14,1 (11,5-14,8)	17,0 (12,8-29,9)
Izložene	11	33,1 (31,6-38,4)	25,3 (22,6-93,2)	13,2 (11,8-14,4)**	15,1** (11,8-16,3)
<i>Pokus 3</i>					
Kontrola	14	35,8±1,83 36,1 (31,6-38,6)	30,3±1,35 30,4 <sup>§</sup> (27,9-32,6)	15,1±0,605 15,2 (13,8-16,2)	22,7±2,51 23,0 (17,0-25,7)
Izložene	10	40,7±1,61 40,4* (37,6-43,8)	27,3±1,81 27,4* <sup>§</sup> (23,8-30,0)	14,2±0,518 14,2* (13,3-15,0)	22,2±1,52 22,5 (20,2-25,1)
Kontrola – neskotne	5	37,6±2,66 37,8 (33,8-41,0)	28,6±0,914 28,4 (27,7-30,0)	–	–
Izložene – neskotne	14	41,1±2,90 40,2** (36,7-47,7)	29,0±2,13 29,1 (25,9-34,0)	–	–

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija i kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi za normalno distribuirane podatke te samo kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi za nenormalno distribuirane podatke. <sup>a</sup>N=2.

\*Statistički značajna razlika (P<0,05) između izložene i kontrolne skupine testirana Studentovim *t*-testom za normalno distribuirane podatke.

\*\*Statistički značajna razlika (P<0,05) između izložene i kontrolne skupine testirana Wilcoxon-Mann-Whitney testom za nenormalno distribuirane podatke.

<sup>§</sup>Statistički značajan učinak skotnosti (P<0,05) testiran dvosmjernom analizom varijance (ANOVA) i Tukeyevim *post hoc* HSD testom.

**Tablica 16.** Količine bakra u unutrašnjim organima štakorice, jetri i bubregu te posteljici i fetusu posljednjeg dana peroralnog izlaganja kadmiju (50 mg Cd/l u obliku klorida) u vodi za piće u skotnih štakorica izloženih od 1. do 19. odnosno 20. dana skotnosti i u neskotnih štakorica izloženih pod jednakim uvjetima tijekom 20 dana

		Količine bakra			
Pokus/ skupina	N	Jetra	Bubreg (µg/g mase svježeg tkiva)	Posteljica	Fetus
<u>Pokus 1</u>					
Kontrola	3	3,11±0,573	29,1±8,62	2,06±0,140	1,71±0,643
Izložene	3	10,0±10,4	17,4±2,73	6,03±6,45	1,45±0,545
<u>Pokus 2</u>					
Kontrola	9	5,33±0,319 5,43 (4,94-5,75)	22,5 ±7,67 21,3 (7,73-35,0)	3,42±0,310 3,41 (2,85-3,78)	2,03±0,547 1,92 (1,35-3,12)
Izložene	11	5,54±0,568 5,58 (4,69-6,68)	20,5±6,29 19,5 (8,43-30,2)	3,09±0,732 2,97 (1,83-4,50)	1,84±0,484 1,89 (1,05-2,39)
<u>Pokus 3</u>					
Kontrola	14	6,21±0,311 6,19 <sup>§</sup> (5,84-6,73)	28,9±6,37 29,1 <sup>§</sup> (20,2-44,3)	6,05±0,949 6,11 (4,23-7,19)	2,38±0,276 2,42 (1,95-2,85)
Izložene	10	6,24±0,305 6,19 <sup>§</sup> (5,73-6,75)	23,1±4,05 23,7* <sup>§</sup> (15,7-27,5)	5,83±0,789 5,86 (4,68-6,76)	2,33±0,206 2,32 (1,95-2,64)
Kontrola – neskotne	5	6,75 (6,65-6,88)	14,4±3,05 14,2 (11,3-17,9)	–	–
Izložene – neskotne	14	6,87 (6,52-8,58)	16,9±4,56 17,6 (9,65-26,3)	–	–

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija i kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi za normalno distribuirane podatke te samo kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi za nenormalno distribuirane podatke.

\*Statistički značajna razlika ( $P<0,05$ ) između izložene i kontrolne skupine testirana Studentovim *t*-testom za normalno distribuirane podatke.

<sup>§</sup>Statistički značajan učinak skotnosti ( $P<0,05$ ) testiran dvosmjernom analizom varijance (ANOVA) i Tukeyevim *post hoc* HSD testom.

### 4.3. Steroidni hormoni u serumu i posteljici štakorica

Tablica 17. prikazuje količine progesterona i testosterona u posteljičnom tkivu i serumu štakorica posljednjeg dana peroralnog izlaganja kadmiju u vodi za piće (50 mg Cd/l u obliku klorida) u štakorica izloženih 19 odnosno 20 dana tijekom skotnosti. Analize su provedene metodom IEMA u sva tri pokusa, a u posteljičnom tkivu još i metodom ELISA u trećem pokusu (*Pokus 3*).

Rezultati dobiveni metodom IEMA su pokazali nepromijenjene količine progesterona i testosterona u posteljici izloženih štakorica u preliminarnom pokusu (*Pokus 1*) i u *Pokusu 3*. Iako su u *Pokusu 2* nađene poviše količine progesterona i snižene količine testosterona u posteljici štakorica izloženih kadmiju u odnosu na kontrolne štakorice, te se razlike nisu ponovile u trećem pokusu, ni metodom IEMA ni metodom ELISA za količine obaju steroidnih hormona u posteljičnom tkivu. Dobivene vrijednosti progesterona i testosterona u tkivu posteljice mjerene odvojeno metodama IEMA i ELISA su uspoređivane testom linearne korelacije po Pearsonu, kako je prikazano grafički na slici 5. Nađena je statistički značajna podudarnost ( $P=0,0001$ ) za izmjerene vrijednosti obaju steroidnih hormona dvjema metodama s koeficijentima korelacije koji su iznosili 0,74 za progesteron i 0,90 za testosteron.

Nisu pronađene ni razlike u koncentracijama progesterona i testosterona u serumu štakorica metodom IEMA između izloženih i kontrolnih štakorica 20. dana peroralnog izlaganja kadmiju tijekom skotnosti (tablica 17, *Pokus 3*).

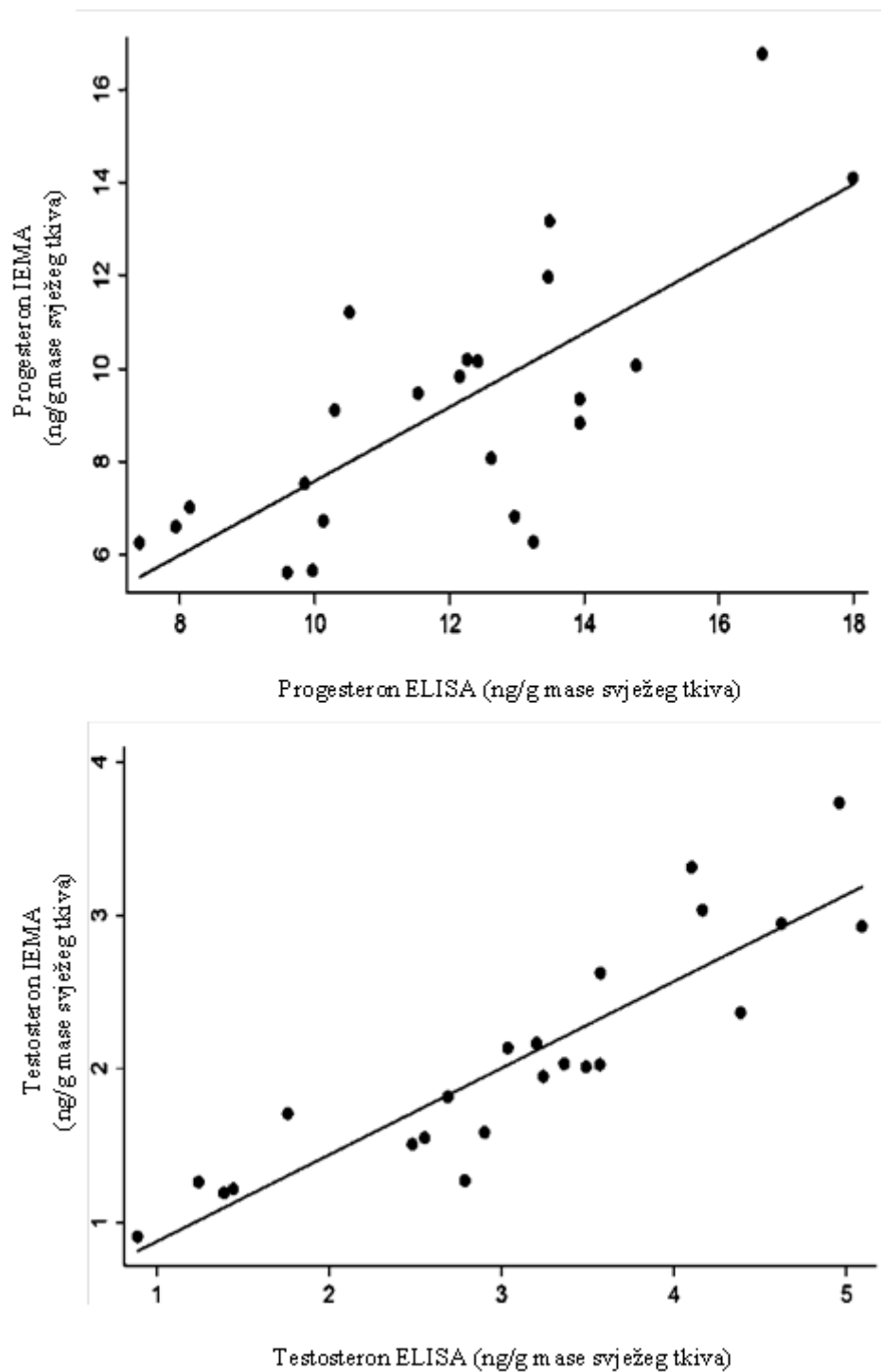
**Tablica 17.** Količine progesterona i testosterona u posteljničnom tkivu izmjerene imunokemijskim metodama IEMA i ELISA i u serumu izmjerene metodom IEMA posljednjeg dana peroralnog izlaganja kadmiju (50 mg Cd/l u obliku klorida) u vodi za piće u štakorica izloženih 19 odnosno 20 dana tijekom skotnosti

Pokus/ skupina	N	Progesteron	Testosteron
Količina u posteljici (ng/g mase svježeg tkiva)			
<u>Pokus 1</u>		<i>IEMA</i>	
Kontrola	3	11,9±1,67	5,37±1,55
Izložene	3	15,6±2,91	3,95±0,638
<u>Pokus 2</u>		<i>IEMA</i>	
Kontrola	9	<sup>a</sup> 6,30±3,29 5,54 (3,21-12,0)	4,39 (3,04-7,06)
Izložene	11	9,91±2,15 10,9 (6,41-12,8)*	<sup>b</sup> 3,09 (2,60-6,48)**
<u>Pokus 3</u>		<i>IEMA</i>	
Kontrola	13	8,83 (5,62-16,8)	2,04±0,881 1,71 (0,906-3,74)
Izložene	10	9,46 (6,73-13,2)	2,07±0,583 2,02 (1,19-3,31)
<u>Pokus 3</u>		<i>ELISA</i>	
Kontrola	13	12,5±3,16 13,0 (7,40-18,0)	3,11±1,47 2,91 (0,89-5,09)
Izložene	10	11,3±1,77 11,3 (8,15-13,5)	3,06±0,74 3,22 (1,39-4,10)
Koncentracija u serumu (ng/ml)			
<u>Pokus 3</u>		<i>IEMA</i>	
Kontrola	14	136±38,6 137 (70,1-203)	0,683 (0,519-1,25)
Izložene	10	126±25,1 115 (97,5-164)	0,698 (0,571-0,995)

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija i kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi za normalno distribuirane podatke te samo kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi za nenormalno distribuirane podatke. <sup>a</sup>N=8, <sup>b</sup>N=10.

\*Statistički značajna razlika (P<0,05) između izložene i kontrolne skupine testirana Studentovim *t*-testom za normalno distribuirane podatke.

\*\*Statistički značajna razlika (P<0,05) između izložene i kontrolne skupine testirana Wilcoxon-Mann-Whitney testom za nenormalno distribuirane podatke.



**Slika 5.** Količine steroidnih hormona progesterona i testosterona u posteljicama svih štakorica neovisno o izlaganju kadmiju izmjerene dvjema imunokemijskim metodama, IEMA i ELISA, i uspoređene testom linearne korelacije po Pearsonu kojim su pokazane statistički značajne podudarnosti ( $P=0,0001$ ) upotrijebljenih metoda prilikom mjerenja obaju vrsta posteljičnih steroidnih hormona.

## 5. RASPRAVA

U ovom su istraživanju procjenjivani učinci peroralne izloženosti kadmiju tijekom graviditeta na funkcije posteljice u prijenosu mikronutrijenata od majke do fetusa i sintezi steroidnih hormona u posteljici. Obje vrste funkcija su neophodne za održavanje trudnoće i prehranu fetusa kako bi se osigurao normalan rast i razvoj ploda *in utero* (Hendrickx i Houston, 1970; Magos i Webb, 1983; Pasqualini i Kincl, 1985; Piasek i sur., 2007; Furukawa i sur., 2011). Takvih podataka o kadmiju, neizbježnom onečišćivači ljudskog okoliša, u uvjetima njegovog najčešćeg puta izloženosti za opće stanovništvo *per os*, hranom i vodom, kakav smo primijenili u ovom istraživanju rabeći odabrane pokazatelje do sada nema u literaturi.

Istraživanje je provedeno u tri pokusa na spolno zrelim pokusnim štakoricama Wistar (ukupno 106 štakorica) s jednim preliminarnim (*pilot*) istraživanjem i nakon toga u dva pokusa u nizu (na ukupno 86 štakorica). Sve analize su provedene na dan usmrćenja pri kraju skotnosti i, osim praćenja unosa pića, hrane i tjelesnih masa štakorica, ostali pokazatelji su određeni jednokratno i presječno. Rezultati i provedene statističke obrade podataka su prikazani unutar pojedinih pokusa, a istovjetni nalazi nisu zbrajani, niti su statistički testirane razlike istovjetnih skupina nalaza između pojedinih pokusa. **Konačne zaključke ovog istraživanja temeljimo na rezultatima zadnjeg pokusa u nizu (Pokus 3)**, u čijoj smo provedbi i obradi rezultata iskoristili iskustva stečena tijekom prethodnih pokusa u poboljšanju metoda pripreme uzoraka za analize elemenata u krvi, unutrašnjim organima štakorica, posteljicama i fetusima te steroidnih hormona progesterona i testosterona u posteljicama i serumu (Mikolić i sur., 2014).

Novi aspekti ovog istraživanja su bila mjerenja količina najvažnijih esencijalnih mikroelemenata u organizmu buduće majke uključujući posteljicu i fetus, koji je prvi okoliš razvoja i rasta novog organizma *in utero*. Količine tih mikroelemenata smo usporedili s nalazima u organizmu neskotne štakorice jednake dobi i izložene kadmiju pod jednakim uvjetima. Pored toga su određivane i količine steroidnih hormona progesterona i testosterona u posteljici i serumu neposredno prije roka okoćenja kako bi se procijenile moguće opasnosti na steroidogenezu u uvjetima peroralne izloženosti kadmiju tijekom trudnoće.

### ***O učincima peroralne izloženosti kadmiju na opće zdravlje izložene štakorice***

Čitavo vrijeme tijekom izlaganja kadmiju u uvjetima primijenjenim u istraživanju **nije bilo znakova ozbiljnih općih toksičnih učinaka u izloženih štakorica**, što je bilo u sukladnosti s očekivanim nalazima. To je utvrđeno praćenjem općeg zdravstvenog stanja, izgleda i ponašanja životinja u kavezima i mjerenjima prosječnog prirasta tjelesne mase te svakodnevnog unosa krmiva i tekućine za napajanje po pokusnim skupinama.

Nađen smanjeni unos tekućine za napajanje u izloženih štakorica je također očekivan i u sukladnosti s prije opisanim nalazima smanjenog unosa pića pod sličnim uvjetima izloženosti kadmiju u štakorica pri dozama od 50 do 180 mg/l (Sowa i Steibert, 1985; Baranski, 1987; Sorell i Graziano, 1990; Kostial i sur., 1993; Schönwald, 1993; Samuel i sur., 2011). Taj se nalaz djelomice može pripisati promijenjenim organoleptičkim svojstvima tekućine za napajanje izloženih štakorica. Međutim, uzevši u obzir podatke u literaturi i povezujući nalaz smanjenog unosa tekućine za napajanje i povećane mase svježeg bubrega u izloženih skotnih štakorica u zadnjem pokusu (*Pokus 3*), moglo bi se pretpostaviti da takav rezultat upućuje i na prve znakove nefrotoksičnih učinaka kadmija. Naime, smanjeni unos tekućine za napajanje i povećana svježa masa bubrega kao i u *Pokusu 3* su opisani pored, koji puta i smanjenog prirasta ukupne tjelesne mase, nakon 12-tjedne izloženosti dozi od 50 mg Cd/l u neskotnih štakorica (Brzóska i sur., 2003) ili sedmodnevne izloženosti dozi od 100 mg Cd/l u mužjaka štakora (Novelli i sur., 1998). Iako je poznato, kako je istaknuto i u Uvodu, da je bubreg jedan od najosjetljivijih organa za toksične učinke kadmija u uvjetima dugotrajne izloženosti kadmiju (Johri i sur., 2010; Ginsberg, 2012), kao i da je tijekom graviditeta povećana opasnost od nefrotoksičnih učinaka kadmija zbog njegove povećane mobilizacije ako su u jetri prije skotnosti pohranjene veće količine kadmija (Chan i Cherian, 1993; Chan i sur., 1993), smatramo da se u ovom istraživanju mogu isključiti štetni učinci kadmija na glomerularnu filtraciju kao i oštećenja bubrega. To temeljimo na opažanjima da su sve životinje bile dobrog općeg stanja i izmjerene količine kadmija u bubregu izloženih skotnih štakorica su bile 7 do 9 µg/g mase svježeg tkiva što je daleko ispod procijenjene količine od 200 µg/g mase svježeg tkiva u kori bubrega koja se danas smatra kritičnom za pojavu proteinurije kao pouzdanog biološkog biljega ozbiljnog oštećenja bubrežnih funkcija (ATSDR, 2012).

### ***O perinatalnim učincima kadmija na broj potomaka i njihove tjelesne mase***

U ovom istraživanju također nisu nađeni učinci peroralne izloženosti kadmiju tijekom skotnosti na prosječan broj zametaka i **nije bilo učinaka na prosječan broj živih fetusa** u leglu. Taj nalaz je u sukladnosti s našim prijašnjim rezultatima pri jednakoj dozi izloženosti od 50 mg Cd/l (Schönwald, 1993; Piasek i sur., 1996a; 1996b) i s rezultatima drugih autora koji nisu našli štetne učinke kadmija na veličinu legla nakon izloženosti štakorica tijekom skotnosti tekućinom za napajanje u rasponu doza od 30 do 180 mg Cd/l (Petering i sur., 1979; Sowa i Steibert, 1985; Baranski, 1987; Sorell i Graziano, 1990; Ronco i sur., 2009; 2011; Castillo i sur., 2012) odnosno krmivom u dozama od 10 mg Cd/kg (Blanuša i sur., 1993; Schönwald, 1995) i 200 mg Cd/kg hrane (Pond i Walker, 1975).

Što se tiče **perinatalnih učinaka kadmija na tjelesne mase potomaka**, dosadašnja istraživanja na štakorima i miševima su pokazala da peroralna izloženost majke kadmiju prije i/ili tijekom skotnosti može izazvati fetotoksične učinke, koji se mogu očitovati smanjenom tjelesnom masom fetusa odnosno mladunaca različite dobi nakon okoćenja (u: ATSDR, 2012). Smanjene tjelesne mase fetusa ili mladunaca su nađene nakon peroralne izloženosti štakorica kadmiju u tekućini za napajanje prije i/ili tijekom skotnosti u dozama od 8,4 do 34,4 mg/l (Kelman i sur., 1978; Petering i sur., 1979; Ali i sur., 1986), 50 mg/l (Sorell i Graziano, 1990; Ronco i sur., 2009) i od 60 do 180 mg/l (Baranski, 1987; Sorell i Graziano, 1990). Opisano je i da je izloženost pokusnih mišica kadmiju tijekom skotnosti u dozi od 10 do 40 mg/l u tekućini za napajanje bila povezana sa smanjenim tjelesnim masama mladunaca (Webster i sur., 1978). Smanjene tjelesne mase mladunaca su nađene nakon izloženosti štakorica kadmiju prije i tijekom skotnosti i dojenja u dozi od 10 mg/kg krmiva i s dostatnom, i sa smanjenom količinom željeza u krmivu (Blanuša i sur., 1993; Schönwald, 1995), nakon izloženosti štakorica kadmiju tijekom skotnosti u dozi od 200 mg/kg krmiva (Pond i Walker, 1975) i nakon izloženosti pokusnih mišica prije i tijekom skotnosti i dojenja dozi od 50 mg Cd/kg u krmivu (Whelton i sur., 1988). U prethodnim istraživanjima u jedinici u kojoj je ovaj rad izrađen također su nađene smanjene tjelesne mase mladunaca na dan okoćenja (0. dan) te 11. i 21. dan nakon okoćenja kao posljedica izloženosti štakorica dozi od 50 mg Cd/l prije i/ili tijekom skotnosti i dojenja u ukupnom trajanju od 6 ili 10 tjedana (Schönwald, 1993; Piasek i sur., 1996a; 1996b). Međutim, u jednom od tih istraživanja (Kostial i sur., 1993), pri izloženosti jednakoj dozi od 50 mg Cd/l, koja je trajala i prije i tijekom skotnosti i dojenja (ukupno 10 tjedana) nisu nađene smanjene tjelesne mase mladunčadi neposredno nakon okoćenja već tek 21. dan nakon okoćenja i to se zadržalo mjesec dana nakon prestanka



izloženosti kadmiju. Istodobno su slične nalaze objavili Gupta i suradnici (1993) u štakorica izloženima dozi od 50 mg Cd/l tijekom skotnosti i do 21. dana dojenja, pri čemu je do smanjenja tjelesnih masa mladunčadi došlo tek 7., 14. i 21. dana nakon okoćenja, ali ne i neposredno nakon okoćenja. Smanjene tjelesne mase mladunčadi 10. i 21. dana nakon okoćenja uočili su Samuel i suradnici (2011) nakon izloženosti štakorica kadmiju u dozama od 50 i 200 mg/l od 10. do 22. dana skotnosti. Svi ti nalazi su u sukladnosti s našim rezultatima.

Uzevši u obzir prije opisane podatke u literaturi, rezultati ovog istraživanja koji su pokazali da nije bilo smanjenja broja fetusa i njihovih tjelesnih masa pri kraju skotnosti su u sukladnosti s prijašnjim vlastitim nalazima istraživačke skupine unutar koje je ovaj rad izrađen i koji su pokazali da nije bilo učinaka na tjelesne mase mladunaca unutar 24 sata nakon okoćenja zbog izloženosti štakorica jednakoj dozi od 50 mg Cd/l prije i tijekom skotnosti i dojenja (Kostial i sur., 1993). Budući da su istraživačkim protokolom sve skotne ženke uspavane i njihovi plodovi (fetusi) uzorkovani carskim rezom kako bi se proučavale funkcije posteljica, nakon čega su štakorice usmrćene, u okviru ovog istraživanja nismo pratili postnatalno preživljavanje kao ni prirast tjelesnih masa i stanje esencijalnih mikronutrijenata nakon okoćenja. Te aspekte povezujemo s rezultatima vlastitih prethodnih istraživanja u štakorica izloženih prije i/ili tijekom skotnosti odnosno i nakon okoćenja do odbijanja 21. dana jednakoj dozi kadmija u vodi za piće (Schönwald, 1993; Kostial i sur., 1993; Piasek i sur., 1996a; 1996b; Katić i sur., 2008; Mikolić i Piasek, 2010; Mikolić i sur., 2014; Piasek i sur., 2014). Rezultati ovog istraživanja su također u sukladnosti s nalazima drugih autora koji su opisali nepromijenjene tjelesne mase fetusa i mladunaca neposredno nakon okoćenja u uvjetima izloženosti dozama od 30 mg Cd/l tijekom skotnosti (Ronco i sur., 2011) i 50 mg Cd/l tijekom 21 dana skotnosti (Sowa i Steibert, 1985) odnosno, kako je gore opisano, tijekom skotnosti i dojenja (Gupta i sur., 1993).

Prosječan unos kadmija u svim prijašnjim istraživanjima u kojima nije bilo smanjenja tjelesnih masa potomaka zbog izloženosti majke je iznosio 5 do 6,3 mg/kg tjelesne mase izložene štakorice na dan (Sowa i Steibert, 1985; Gupta i sur., 1993; Kostial i sur., 1993). To odgovara procijenjenoj količini prosječnog unosa kadmija od 6,5 mg/kg tjelesne mase izložene skotne štakorice na dan u našem istraživanju (*Pokusi 2 i 3*) izračunatoj na temelju prosječnog svakodnevnog unosa tekućine za napajanje koja je sadržavala otopinu kadmijevog klorida u dozi od 50 mg Cd/l. Prosječna izračunata doza kadmija kojoj su štakorice bile izlagane tijekom ovog istraživanja bez obzira na stanje skotnosti (*Pokusi 2 i 3*) je iznosila 7 (5,8 do 7,9) mg/kg tjelesne mase na dan. Imajući na umu da je želučanocrijevna apsorpcija

kadmija u štakorica do oko 3% i da se tijekom skotnosti poveća barem oko 2 puta (Bhattacharyya, 1991), procijenjena želučanocrijevana apsorpcija bi bila 6%, a izračunata prosječna količina kadmija koju je svaki dan unosila izložena skotna štakorica u ovom istraživanju oko 0,1 mg na dan ili ukupno tijekom cijelog razdoblja izlaganja oko 2,0 mg. U neskotnih štakorica izračunat svakodnevni unos kadmija bi bio oko 0,06 mg na dan ili ukupno oko 1,2 mg. Time smo potvrdili da je tijekom skotnosti dvostruko povećan prosječan unos kadmija kako je prije pokazano u pokusima na mišicama (Bhattacharyya i sur., 1981; 1982; 1986; Bhattacharyya, 1991). Do sličnih zaključaka su došli Ronco i suradnici (2009) u istraživanju na pokusnim štakoricama izlaganima dozi od 50 mgCd/l 21 dan tijekom skotnosti koji su izračunali da je unos kadmija tijekom čitavog razdoblja skotnosti, uz apsorpciju od 10%, bio 2,5 mg.

Različiti rezultati učinaka peroralne izloženosti kadmiju tijekom skotnosti na tjelesne mase fetusa odnosno perinatalno izloženih mladunaca štakora i miševa dobiveni u uvjetima peroralne izloženosti jednakim ili sličnim dozama kadmija kao i u ovom istraživanju mogu se protumačiti sljedećim razlikama: različitim duljinama i razdobljima izloženosti s obzirom na početak skotnosti (trajanje izloženosti prije i tijekom skotnosti, samo tijekom skotnosti ili izloženost koja traje i nakon skotnosti), razlikama u sastavu krmiva koje se unosi u organizam istodobno s kadmijem *per os* te različitim vrstama i sojevima malih laboratorijskih glodavaca u pojedinim pokusnim modelima *in vivo*.

### ***O nakupljanju kadmija i njegovim međudjelovanjima s esencijalnim elementima tijekom skotnosti***

Tijekom skotnosti, prijenos svih esencijalnih nutrijenata od majke do fetusa se odvija kroz posteljicu i on se, zbog povećanih potreba fetusa, povećava prema kraju skotnosti (u: Gambling i sur., 2003). To se može povezati s fiziološkim povećanjem broja korionskih resica u posteljici tijekom skotnosti čime je znatno povećana površina za prijenos nutrijenata i razmjenu plinova između majke i fetusa (Hendrickx i Houston, 1970; Magos i Webb, 1983; Pasqualini i Kincl, 1985; Furukawa i sur., 2011). Kao što je već istaknuto, osim prijenosa esencijalnih elemenata tijekom graviditeta kroz posteljicu mogu proći i neesencijalni, toksični elementi u različitim količinama ako su prisutni u majčinom krvotoku. Budući da se većina kadmija nakuplja u posteljici, veoma mali udjel kadmija dopijeva do fetusa *in utero*, koji je u skotnih pokusnih miševa procijenjen na samo 0,001% ukupne peroralno unesene doze kadmija (Brako i sur., 2003).

U ovom istraživanju su nađene **veće koncentracije kadmija u krvi skotnih štakorica** u odnosu na neskotne. Povećani unos tekućine za napajanje u skotnih u odnosu na neskotne štakorice u drugom dijelu skotnosti/trajanja izloženosti kadmiju je povećao dostupnost kadmija u skotnih štakorica (*Pokus 3*). Zbog fizioloških povećanja mase organa tijekom skotnosti, svježe mase jetre i bubrega su bile više u skotnih štakorica, a budući da se količine kadmija nisu razlikovale između skotnih i neskotnih štakorica, izračunate **ukupne mase kadmija u jetri i bubregu su bile veće 1,5 do 2 puta u skotnih izloženih štakorica** vs. neskotne izložene štakorice i iznosile 56 vs. 26 µg u jetri i 7 vs. 5 µg u bubregu. Ti su nalazi u sukladnosti s rezultatima niza istraživanja koja su proveli i opisali Bhattacharyya i suradnici (1981; 1982; 1986; 2000) na pokusnim miševima, u kojima su našli da je izlaganje kadmiju u vodi za piće tijekom skotnosti i dojenja povezano s povećanim nakupljanjem kadmija u unutrašnjim organima, najviše u bubregu i dvanaesniku. U bubregu su količine kadmija tijekom skotnosti bile 2 puta veće, a tijekom dojenja 3 puta veće, dok su u dvanaesniku količine kadmija bile 3 puta veće pri kraju skotnosti, a 2 puta pri kraju dojenja u odnosu na neskotne ženke izložene jednako dugo istoj dozi kadmija. U istraživanjima u kojima su štakorice bile izlagane kadmiju parenteralno prije početka skotnosti (8 doza od 1 mg Cd/kg potkožnim ubrizgavanjem) je pokazano da se količine kadmija u jetri i bubregu skotnih i neskotnih ženki se nisu razlikovale, ali se tijekom skotnosti prethodno nakupljeni kadmij pojačano otpuštao iz jetre u krvni optok i time su se povećale mogućnosti njegovog nakupljanja u bubregu i posteljici (Chan i sur., 1993; Chana i Cherian, 1993). Razlike u

raspodjeli kadmija u unutrašnjim organima majke u tim opisanim istraživanjima u usporedbi s nalazima povećane ukupne mase kadmija u jetri i bubregu u ovom istraživanju pokazuju da na različitu razdiobu kadmija u organizmu buduće majke utječu različiti putovi izloženosti kadmiju (*s.c.* ili *per os*), različite doze kadmija (ukupno 1 mg/kg tjelesne mase na dan tijekom 8 dana *vs.* 6,5 mg/kg tjelesne mase na dan tijekom 20 dana sa želučanocrijevnom apsorpcijom od najviše oko 6%) i različito razdoblje izloženosti s obzirom na početak skotnosti (prije skotnosti *vs.* tijekom skotnosti u ovom istraživanju).

Kadmij je toksičan metal koji ima veliku sposobnost međudjelovanja s drugim elementima ne samo u organizmu sisavaca, već i u hrani. Standardno krmivo za laboratorijske štakore i miševe upotrijebljeno u ovom istraživanju je davano jednako i izloženim, i kontrolnim životinjama za podmirivanje svih potreba životinja za hranjivim tvarima, uključujući mikroelemente koje smo proučavali. Ti su mikroelementi u krmivu bili u ovim količinama: željeza je bilo 480 mg/kg, cinka 103 mg/kg i bakra 25,7 mg/kg krmiva (tablica 1). Stoga promjene u količinama mikroelemenata u analiziranim uzorcima tkiva u ovom radu odražavaju međudjelovanja kadmija i mikroelemenata željeza, cinka odnosno bakra, na jednom ili više mjesta u organizmu nakon unosa kadmija i tih esencijalnih elemenata u organizam. Prema nalazima količina esencijalnih elemenata u pojedinim tjelesnim odjeljcima majke, posteljici i fetusu u našem istraživanju te povezujući naše nalaze s podacima u literaturi o mjestima međudjelovanja kadmija i esencijalnih mikroelemenata, možemo zaključiti da je do međudjelovanja kadmija i ispitivanih esencijalnih elemenata došlo na ovim razinama u organizmu izložene pokusne štakorice:

- 1) u želučanocrijevnom sustavu štakorice tijekom apsorpcije elemenata unesenih *per os*;
- 2) u jetri i bubregu nakon što je kadmij dospio u njih;
- 3) u posteljici skotnih izloženih štakorica tijekom prijenosa mikroelemenata do fetusa.

Na temelju samo naših rezultata ne možemo zaključivati o mehanizmima prijenosa, načinima međudjelovanja u organima u kojima se nakupljao kadmij, kao ni o načinima prijenosa esencijalnih elemenata od majke do fetusa kroz posteljicu. U Uvodu su prikazane najvažnije do sada poznate činjenice o tim aspektima u dostupnoj literaturi.

### ***O međudjelovanju kadmija i željeza odnosno željeza i bakra***

Pored povećanih unosa i količina kadmija u organizmu izloženih skotnih u odnosu na izložene neskotne štakorice, pri peroralnoj izloženosti kadmiju u ovom istraživanju je došlo do  **smanjenja količina željeza u jetri i bubregu štakorica izloženih tijekom skotnosti** i do  **smanjenja željeza u fetusima**. Smanjene količine željeza u jetri štakorica i u njihovih mladunaca na dan okoćenja su također opisane nakon izlaganja višoj dozi kadmija (200 mg/kg) u krmivu tijekom skotnosti što je bilo protumačeno učinkom kadmija na smanjenu apsorpciju željeza iz probavnog sustava (Pond i Walker, 1975). Rezultati vlastitih istraživanja su pokazali da je izloženost štakorica nižoj dozi kadmija (10 mg/kg) u krmivu 2 tjedna prije parenja i tijekom skotnosti i dojenja uzrokovala smanjene količine željeza u jetri majki te u jetri i bubregu mladunaca 11 dana nakon okoćenja (Blanuša i sur., 1993; Schönwald, 1995). Također su i drugi autori pri nižim dozama kadmija (8,6 do 34,4 mg/l) u vodi za piće prije i tijekom skotnosti u štakorica našli smanjene količine željeza u mladunaca, a izloženost prije skotnosti nije imala učinaka na stanje esencijalnih elemenata (Petering i sur., 1979). Otprilike dva desetljeća nakon tih opažanja je dokazan zajednički prijenosnik divalentnih metala željeza i kadmija DMT1 u dvanaesniku sisavaca (Gunshin i sur. 1997) čime je potvrđeno da do međudjelovanja toksičnog kadmija i esencijalnog željeza dolazi na razini želučanocrijevne apsorpcije, naročito u dvanaesniku.

Smanjene količine željeza u jetri, bubregu, posteljici i fetalnoj jetri su nađene i u prijašnjim istraživanjima provedenim pod jednakim uvjetima i dozi kadmija od 50 mg/l *per os* tijekom 21 dana skotnosti (Sowa i Steibert, 1985; Chmielnicka i Sowa, 1996). U vlastitim istraživanjima u jedinici u kojoj je ovaj rad izrađen su nađene smanjene količine željeza u jetri i bubregu štakorica izloženih 50 mg Cd/l u vodi za piće prije i/ili tijekom skotnosti i dojenja i u njihovih mladunaca 21 dan nakon okoćenja (Schönwald, 1993; Piasek i sur., 1996a; 1996b). Niže količine željeza u organima i fetusu štakorica izloženih kadmiju mogu se djelomično objasniti smanjenom raspoloživošću željeza zbog njegovog natjecanja s kadmijem pri prijenosu u crijevima (u: Thévenod, 2010). Međudjelovanja kadmija i željeza u jetri i bubregu buduće majke mogu utjecati na smanjenja željeza u unutrašnjim organima majke, što istodobno sa smanjenim prijenosom željeza kroz posteljicu zbog nakupljanja kadmija u posteljičnom tkivu rezultira smanjenim količinama željeza u fetusu (Piasek i sur., 2004; 2007).

U istraživanju u kojem su štakorice izlagane kadmiju parenteralno u dobi od 9 tjedana (5 potkožnih doza od 2 mg/kg tjelesne mase na dan) nakon čega su se parile u dobi od 13

tjedana i bile usmrćene 14. ili 20. dana skotnosti odnosno 14. dana nakon okoćenja su tijekom skotnosti i dojenja nađene niže količine željeza u jetri i bubregu štakorica izloženih kadmiju u odnosu na neizložene štakorice (Suzuki i sur., 1990). Pokazano je da različiti putovi izloženosti kadmiju u štakorica mogu dovesti do različitih međudjelovanja kadmija i željeza u jetri, pa se smanjene količine željeza u jetri mogu naći nakon peroralne izloženosti, a nakon parenteralne izloženosti kadmiju takve promjene mogu izostati (Oishi i sur., 2000). Štoviše, mogući su nalazi u obrnutom smislu, kako je pokazano nakon subkronične parenteralne izloženosti kadmiju tijekom skotnosti (u ukupnoj dozi 3 ili 5 mg/kg tjelesne mase tijekom 19 dana skotnosti potkožno ugrađenim osmotskim pumpicama) nalazima povećanih količina željeza u cijelom fetusu i u fetalnoj jetri (Piasek i sur., 2004). Također su nađene i povećane količine željeza u jetri skotnih štakorica nakon jednokratne, akutne parenteralne (supkutane) izloženosti dozi od 5 mg Cd/kg tjelesne mase 15. dana skotnosti (Piasek i sur., 2004). Pri tome je najvjerojatnije došlo do međudjelovanja kadmija i željeza u jetri buduće majke i fetalnoj jetri.

U ovom istraživanju smo našli da su u skotnih štakorica količine željeza i bakra u jetri i bubregu bile različite u odnosu na neskotne štakorice bez obzira na izloženost kadmiju. Metabolizmi željeza i bakra su međusobno povezani, posebno tijekom skotnosti kad su oba elementa neophodna za rast i razvoj fetusa kako je detaljno opisano u Uvodu. Nedostatak jednog može poremetiti ravnotežu u metabolizmu drugoga mikronutrijenta i imati štetne učinke na majku i fetus *in utero* kao i dugoročne štetne posljedice u prethodno perinatalno izloženih potomaka (McArdle i sur., 2008). U štakorica hranjenih krmivom s 15 ili 50% bakra tijekom skotnosti (21 dan) nađene su smanjene količine željeza i bakra u fetusu (Andersen i sur., 2007). Obrnuto, nedostatak željeza tijekom skotnosti može utjecati na povećane količine bakra u organima majke, najviše u jetri i posteljici. Nije poznato na koji način dolazi do promjena u količinama bakra u povezanosti s pomanjkanjem željeza, ali je pokazano da ih ne uzrokuju promjene u transkripciji gena proteinskog prijenosnika za bakar (Gambling i sur., 2004).

## ***O međudjelovanju kadmija, cinka i bakra***

Metabolizmi kadmija, cinka i bakra su međusobno povezani, uključujući međusobnu mnogostruku povezanost s proteinskim ligandom MT, pa je teško razdvojiti međudjelovanja kadmija i cinka, kadmija i bakra te cinka i bakra. Izloženost kadmiju može dovesti do nedostatka cinka i bakra, a promijenjeno stanje cinka može poremetiti metabolizam bakra i obrnuto. Već je prije istaknuto da pomanjkanje bilo kojeg esencijalnog elemenata može povećati želučanocrijevnu apsorpciju kadmija i njegovo nakupljanje u organizmu. Biokemijske promjene cinka i bakra u smislu deficijencije ili povećanih količina mogu imati ozbiljne štetne posljedice na zdravlje što se posebno odnosi na fetus i novorođenče (Carmichael i sur., 1982; Brzóška i Moniuszko-Jakoniuk, 2001; Mikolić i Piasek, 2009; Cai i sur., 2010).

Rezultati našeg istraživanja koji pokazuju **povećane količine cinka u jetri štakorica, smanjene količine cinka i bakra u bubregu štakorica te smanjene količine cinka u posteljici i fetusu** nakon izlaganja kadmiju u dozi od 50 mg/l *per os* tijekom skotnosti su u sukladnosti s rezultatima prijašnjih istraživanja provedenih pod sličnim uvjetima izloženosti kadmiju. Nakon izlaganja štakorica dozi od 50 mg Cd/l u vodi za piće tijekom 21 dana skotnosti nađeno je povećanje količine cinka u majčinoj jetri i smanjenje količina cinka i bakra u jetri fetusa (Chmielnicka i Sowa, 1996). Pri dozi od 50 mg Cd/l u tekućini za napajanje od 6. do 20. dana skotnosti nađeno je povećanje količina cinka u jetri i bubregu izloženih štakorica i smanjenje cinka u jetri fetusa, a pri dozi od 100 mg Cd/l smanjenje količina cinka u posteljici i jetri fetusa (Sorell i Graziano, 1990). U prijašnjim istraživanjima u jedinici u kojoj je ovaj rad izrađen u štakoricama izlaganim kadmiju u vodi za piće u dozi od 50 mg/l prije i /ili tijekom skotnosti i dojenja je nađeno povećanje količine cinka u majčinoj jetri i bubregu i smanjenje količine cinka u jetri mladunaca u vrijeme odbijanja od majki 21. dan nakon okoćenja (Schönwald, 1993; Piasek i sur., 1996a; 1996b). Nalazi smanjenih količina željeza, cinka i bakra u fetusu i mladuncima u istraživanjima provedenim pod sličnim uvjetima kao i ovo istraživanje su do sada u literaturi bili objašnjavani smanjenom apsorpcijom tih esencijalnih metala u želučanocrijevnom sustavu majke izložene kadmiju tijekom skotnosti s posljedičnim smanjenim koncentracijama tih elemenata u majčinom krvotoku i smanjenjem njihove raspoloživosti za prijenos posteljicom do fetusa. U slučaju nalaza nepromijenjene količine cinka u posteljici je kao daljnji mogući razlog smanjenja cinka u jetri fetusa navedena i preraspodjela cinka u druge majčine organe (Sowa i Steibert, 1985; Torreblanca i sur., 1992; Chmielnicka i Sowa, 1996).

Opisano je da je peroralna izloženost kadmiju u vodi za piće prije i tijekom skotnosti u pokusnih štakorica i pri nižim dozama bila povezana sa smanjenim količinama esencijalnih elemenata u cijelom tijelu mladunaca (ne precizira se točno dob), cinka pri 17,2 mg Cd/l i bakra pri dozama 4,3 do 34,4 mg Cd/l (Petering i sur., 1979). Nasuprot tome, u pokusnih mišica izloženih dozi od 10 mg Cd/l u vodi za piće tijekom skotnosti i početkom dojenja su nađene povećane količine cinka u jetri i bubregu tek okoćenih mladunaca, a u jetri i bubregu izloženih ženki nije bilo promjena u količinama cinka i bakra (Ishitobi i Watanabe, 2005). Slični nalazi biokemijskih promjena količina cinka u jetri pokusnih štakorica i njihovih mladunaca su nađeni i nakon peroralne izloženosti kadmiju u krmivu pri višim razinama izloženosti. Povećana količina cinka u majčinoj jetri je nađena nakon dugotrajne izloženost kadmiju u dozi od 100 mg/kg krmiva tijekom 41 tjedna (Stonard i Webb, 1976) i pri dozi od 200 mg/kg krmiva tijekom skotnosti, praćena smanjenim količinama cinka, bakra i željeza u mladunaca neposredno nakon okoćenja (Pond i Walker, 1975).

Smanjene količine cinka u bubregu izloženih skotnih štakorica nađene u našem istraživanju su u sukladnosti s rezultatima smanjenog cinka u bubregu štakorica izloženih većoj dozi od 180 mg Cd/l u vodi za piće tijekom 20 dana skotnosti, pri čemu je također nađen smanjeni cink u jetri fetusa (Baranski, 1987). Oishi i suradnici (2000) su našli povećane količine kadmija i cinka u jetri i bubrezima štakorica neovisno o dozi i putu izloženosti, peroralno ili parenteralno.

Slični učinci kadmija na raspodjelu esencijalnih elemenata cinka i bakra u budućim majkama i fetusima su nađeni u nizu istraživanja u uvjetima parenteralnog izlaganja kadmiju tijekom skotnosti i dojenja u pokusnih štakorica. U prije spomenutom istraživanju koje su proveli Suzuki i suradnici (1990) s parenteralnim izlaganjem kadmiju (5 potkožnih doza od 2 µg/kg tjelesne mase na dan od 9. tjedna života i s parenjem u dobi od 13. tjedana) su nađene povećane količine i cinka, i bakra u jetri i bubregu izloženih štakorica u usporedbi s neizloženim štakoricama 14. i 20. dana skotnosti odnosno 14. dana nakon okoćenja. Do istodobnog nakupljanja kadmija i cinka u jetri je došlo zbog njihovog vezanja za MT i te su se vrijednosti postupno smanjivale tijekom skotnosti zbog fiziološkog povećanja jetre. Slično postupno smanjenje nakupljenog bakra je protumačeno, pored povećanja jetre tijekom skotnosti, posljedicom pretežitog vezanja bakra u enzimu Cu/Zn-SOD čija se koncentracija tijekom skotnosti smanjivala, a samo u manjoj mjeri za MT. Nakon izlaganja kadmiju potkožnim ubrizgavanjem (u dozama do 1 mg/kg tjelesne mase od 1. do 19. dana skotnosti) je nađen porast količine cinka u majčinoj jetri i smanjenje količine cinka u fetalnoj jetri u ovisnosti o dozi kadmija, dok je količina cinka u posteljici bila nepromijenjena što je



protumačeno mogućim remećenjem nepoznatog proteinskog prijenosnika za cink kroz posteljicu (Roelfzema i sur., 1988). U prijašnjim istraživanjima u jedinici u kojoj je ovaj rad izrađen su nađeni učinci parenteralne akutne i subkronične izloženosti štakorica kadmiju tijekom skotnosti (pri dozama od 3 ili 5 mg/kg tjelesne mase potkožno) na povećanja količina cinka u jetri i bubregu skotnih štakorica uz istodobno smanjenje količine cinka u fetusu (Piasek i sur., 2004). Povećanja količina cinka u majčinoj jetri i bubregu su bila objašnjena na temelju dostupnih literaturnih podataka mogućnošću poticanja povećane sinteze MT kadmijem.

Povećane količine cinka u jetri izloženih skotnih i neskotnih štakorica nađene u našem istraživanju se slažu s rezultatima istraživanja Chana i Cheriana (1993) koji su dobili jednake nalaze tjedan dana nakon posljednjeg parenteralnog izlaganja štakorica kadmiju (potkožnim ubrizgavanjem 1 mg/kg tjelesne mase na dan tijekom 8 dana prije skotnosti). Ti autori su tijekom skotnosti u štakorica (nakon što je prestala izloženost kadmiju) našli smanjene količine cinka u jetri i bakra u jetri i bubregu u odnosu na neskotne štakorice. Naše istraživanje je pokazalo da i stanje skotnosti samo po sebi, neovisno o izloženosti kadmiju, utječe na smanjenje količine bakra u jetri i povećanje količine bakra u bubregu.

U našim prethodnim istraživanjima provedenim pod jednakim uvjetima izloženosti kadmiju su nađene smanjene količine cinka u posteljici i fetusu (Katić i sur., 2008; Mikolić i Piasek, 2010). Naši rezultati su u sukladnosti s rezultatima istraživanja Kuriwaki i suradnika (2005) koji su našli smanjene količine željeza, cinka i bakra u jetri fetusa nakon izloženosti štakorica kadmiju *per os* (10 mg/l od 9. do 19. dana skotnosti želučanom sondom). S obzirom na to da su količine željeza i cinka u posteljici bile nepromijenjene, autori su zaključili da su smanjenja količina željeza i cinka u jetri fetusa bila posljedica ometanog prijenosa tih elemenata od posteljice do fetusa. Nađena je smanjena količina bakra u posteljici, pa su smanjene količine bakra u fetusu autori objasnili ometanjem unosa i prijenosa bakra kroz posteljicu. Nisu istraživani prijenosnici navedenih esencijalnih mikroelemenata kroz posteljicu. Ni naši rezultati ne dozvoljavaju zaključivanja o prijenosnim mehanizmima elemenata kroz posteljicu. Uvidom u dostupnu literaturu može se općenito reći, kako je detaljnije opisano u Uvodu, da su prijenosnici i esencijalnih elemenata i kadmija kroz posteljicu još velikim dijelom nepoznati.

Porast cinka u jetri i smanjenje cinka u bubregu i posteljici nađeni u ovom istraživanju najvjerojatnije su povezani s povećanom sintezom MT u jetri štakorica izloženih kadmiju. Za to nemamo izravnih dokaza jer nismo mjerili količine MT u ispitivanim uzorcima. Općenito se smatra da se izazivanjem sinteze MT može smanjiti toksičnost kadmija, pogotovo prilikom

akutnih otrovanja. Pri tome treba imati na umu da je MT proteinski ligand koji vezanjem kadmija može omogućiti i njegovo povećano nakupljanje u stanicama unutrašnjih organa, posebice u jetri, pa se tako zapravo mogu povećati mogućnosti za kronične toksične učinke kadmija, a ne povoljno ili „detoksificirajuće“ djelovanje kompleksa Cd-MT u tim organima (Waalkes i Pérez-Ollé, 2000; Cai i sur., 2010). O tome su ukratko opisane dosadašnje spoznaje iz dostupne literature u Uvodu. Naši rezultati koji pokazuju porast količine cinka u jetri buduće majke izložene kadmiju su primjer kako zbog izazivanja povećane sinteze MT kadmijem može doći do nepovoljnog utjecaja na raspodjelu cinka u maternalno-fetalnom sustavu tijekom skotnosti s njegovim zadržavanjem u tjelesnim odjeljcima majčinog organizma, poglavito u jetri, u uvjetima kada postoji povećana potreba za prijenos cinka u plod koji se razvija u maternici. Ti procesi mogu predstavljati opasnost za zdravlje potomaka izazivanjem brojnih štetnih učinaka u rasponu od teratogenih učinaka s raznim tjelesnim malformacijama potomka do smanjene dostupnosti cinka za rast i razvoj embrija odnosno fetusa neposredno *in utero*, ali i s mogućim dalekosežnim posljedicama na postnatalni rast i razvoj te zdravstveno stanje u odrasloj dobi.

## ***O učincima kadmija na steroidogenezu u posteljici pokusne štakorice***

U ovom radu su procjenjivani učinci subkronične peroralne izloženosti kadmiju na steroidogenezu tijekom skotnosti štakorice usredotočeno na model štakorske posteljice i njezinu ulogu u stvaranju progesterona i testosterona koji su nužni za održanje skotnosti i preživljavanje fetusa *in utero* do okoćenja zdravog potomka sposobnog za samostalan život izvan maternice. Model štakorske posteljice je koristan u takvim istraživanjima zbog određenih sličnosti s ljudskom posteljicom, pogotovo tijekom njezinog ranog razvoja (Beck, 1981; de Rijk i sur., 2002; Furukawa i sur., 2011; Šerman i Šerman, 2011). Pri tome se moraju imati na umu razlike s ljudskom posteljicom kao i specifične značajke u steroidogenezi tijekom skotnosti štakorice, kako je detaljnije opisano u Uvodu.

Izmjerene su koncentracije steroidnih hormona u serumu i njihove količine u posteljici blizu roka okoćenja, 19. ili 20. dana skotnosti, što je temeljeno na sljedećim podacima u literaturi. Sinteza progesterona u štakorskoj posteljici je najveća 12. dana i ostaje povećana do kraja skotnosti, dok sinteza testosterona u štakorskoj posteljici postupno raste do 18. dana skotnosti i nakon toga se smanjuje do okoćenja (Matt i Macdonald, 1984). U posteljici štakorica u kasnoj skotnosti dolazi do pomaka u steroidogenezi tako da se iz progesterona počinju pretežito stvarati androgeni, koji služe kao prekursori za sintezu estradiola u jajniku (Jackson i Albrecht, 1985; Payne i Hales, 2004). Za cijelo vrijeme trajanja skotnosti štakorice, sinteza testosterona se odvija i u jajnicima, i u posteljici. Povećane koncentracije testosterona su nađene u serumu štakorica 18. odnosno 20. dana graviditeta što odgovara porastu njihove sinteze u posteljici (Matt i Macdonald, 1984). Stoga koncentracije progesterona i testosterona u serumu štakorica izmjerene u našem istraživanju odražavaju produkciju obaju steroidnih hormona u oba steroidogena organa, posteljici i jajniku, koji su aktivni tijekom cijele skotnosti štakorice.

U literaturi općenito nema podataka o vrijednostima steroidnih hormona blizu roka okoćenja pokusnih štakorica i **do sada nema podataka o količinama progesterona i testosterona u štakorskoj posteljici pri kraju skotnosti**. Također su oskudni podaci o učincima kadmija, pogotovo u uvjetima peroralne izloženosti na biosintezu steroidnih hormona tijekom cijele skotnosti štakorice kao i ni na testosteron u posteljici, koji je prekursor sinteze estradiola u jajniku tijekom skotnosti. U prethodnim istraživanjima provedenim u okviru međunarodne znanstvene suradnje, čiji su rezultati objavljeni u jedinici u kojoj je ovaj rad izrađen, na štakoricama Sprague-Dawley izlaganima kadmiju parenteralno tijekom skotnosti (u ukupnim dozama od 3 ili 5 mg/kg tjelesne mase potkožno ugrađenim

osmotskim pumpicama od 1. do 19. dana skotnosti) također nisu nađene promjene u stvaranju testosterona u posteljici blizu roka okoćenja kao ni u steroidogenezi u jajnicima u kasnoj skotnosti. Jedino je u izloženih štakorica istodobno hranjenih krmivom sa smanjenom količinom željeza nađena smanjena produkcija progesterona u posteljici blizu termina okoćenja pokazujući da izloženost kadmiju i prehrana osiromašena željezom tijekom graviditeta imaju zajednički učinak na produkciju progesterona, koji je linearan i ovisan o dozi kadmija (Piasek i sur., 2000; 2002). Valja istaknuti da je u uvjetima izloženosti u tim prijašnjim istraživanjima količina kadmija kao biološkog biljega izloženosti bila u prosjeku oko 5 (3 do 10) puta viša ( $>2000$  ng/g svježe mase tkiva) u odnosu na raspone izmjerenih količina kadmija u posteljici u pokusima sadržanim u ovom istraživanju (ca. 200-600 ng/g svježe mase tkiva) što je je grafički prikazano u radu Piasek i suradnici (2014). Daljnja istraživanja disrupcije posteljične steroidogeneze u pokusnih štakorica trebala bi uključiti niže razine izloženosti kadmiju kako su zaključili i drugi autori, primjerice Ishitobi i Watanabe (2005) koji su istraživali učinke perinatalne izloženosti nižoj dozi kadmija (1 i 10 mg/l) na postnatalni spolni razvoj ženskih potomaka. Općenito se smatra da endokrina disrupcija nastaje pri izloženostima niskim ili veoma niskim dozama kemijskih tvari s mogućim svojstvima endokrine disrupcije budući da endokrina signalizacija uključuje veoma male promjene u razinama endogeno stvorenih hormona koje dovode do važnih bioloških učinaka (NIEHS/NTP, 2010).

Slično prijašnjim rezultatima u istraživačkoj skupini unutar koje je provedeno i ovo istraživanje, ni peroralna izloženost kadmiju tijekom graviditeta u ovom radu nije imala učinaka na koncentracije progesterona i testosterona u serumu i količine obaju steroidnih hormona u posteljicama izloženih štakorica. Rezultati dobiveni u jednom pokusu (*Pokus 2*) su upućivali na povećanje progesterona i smanjenje testosterona u posteljici blizu roka okoćenja. Te rezultate nismo potvrdili u trećem pokusu (*Pokusu 3*) u kojemu smo dvjema imunokemijskim metodama, IEMA i ELISA, potvrdili da nema učinka kadmija na steroidogenezu štakorica u uvjetima izloženosti kadmiju kakvi su bili u našem istraživanju.

U Uvodu je opisano da je pokazano kako kadmij može inhibirati sintezu progesterona djelujući na specifičnim mjestima u biosintezi steroidnih hormona u kulturama stanica ljudskog sinciotrofoblasta izloženima kadmiju *in vitro* (Jolibois i sur., 1999a; 1999b; Kawai i sur., 2002; Henson i Chedrese, 2004). Rezultati istraživanja koja su provedena u jedinici u kojoj je ovaj rad izrađen na ljudskim posteljicama *ex vivo* (Piasek i sur., 2001) bili su u suglasju s navedenim nalazima *in vitro* i pokazali su upola smanjene količine progesterona uz istodobna dvostruka povećanja kadmija u posteljicama zdravih pušačica izloženima kadmiju

udisanjem duhanskog dima u odnosu na nalaze u posteljicama nepušačica. Međutim, u daljnjem istraživanju (Stasenko i sur., 2010) usprkos nađenih dvostruko većih količina kadmija u posteljicama pušačica u odnosu na nepušačice, nisu potvrđene prije nađene razlike u količinama progesterona u posteljicama *ex vivo* u ovisnosti o izlaganju kadmiju zdravih osoba aktivnim pušenjem. Razlike u nalazima posteljičnih količina progesterona mogu se objasniti uporabom različitih metoda mjerenja progesterona. To je u prvom istraživanju bila specifična radioimunokemijska metoda RIA, a u drugom imunokemijska metoda IEMA. U ovom istraživanju su korištene imunokemijske metode IEMA i ELISA. Treba naglasiti da je općenito teško ili zapravo nemoguće uspoređivati istraživanja provedena na pokusnim štakoricama izloženima kadmiju *per os*, kao što je to bilo u ovom radu, sa spomenutim istraživanjima na ljudskim posteljicama *in vitro* ili *ex vivo*. Radi se o različitim istraživačkim pristupima (eksperimentalnom vs. epidemiološkom), razlikama u vrstama posteljica (štakorskoj vs. ljudskoj), različitim putovima unosa kadmija u organizam (*per os* vs. parenteralno - udisanjem duhanskim dimom), različitim razinama izloženosti, različitim vrstama i stopama apsorpcije kadmija u organizam sisavca uključujući čovjeka (što je općenito višestruko više u uvjetima parenteralne nego peroralne izloženosti). Stoga su i konačni rezultati različiti: količine kadmija nakon peroralne izloženosti štakorica kadmiju u ovom istraživanju su 10 do 20 puta veće u odnosu na količine kadmija u posteljicama pušačica koje su izložene kadmiju iz duhanskog dima u prijašnjim epidemiološkim istraživanjima (Piasek i sur., 2001; Stasenko i sur., 2010; Piasek i sur., 2014). Zbog svih tih razloga je općenito potreban velik oprez prilikom uspoređivanja podataka dobivenih na modelu pokusnih životinja s podacima dobivenih u ljudima uporabom bioloških biljega izloženosti odnosno učinaka kadmija, uključujući moguće učinke kadmija kao kemijske tvari sa svojstvima disruptora na steroidogenezu u posteljici i drugim steroidnim organima, jajniku i testisu.

Rezultati istraživanja na pokusnim štakoricama tijekom i izvan skotnosti, pogotovo uporabom modela štakorske posteljice se ne mogu izravno prenijeti na uvjete stvarnih izloženosti organizma trudne žene i njezinog potomka. Ovo istraživanje je provedeno na pokusnom modelu *in vivo* i zaključci se mogu donijeti samo za primijenjene uvjete izloženosti štakorica kadmiju. Za šira zaključivanja, usporedbe i preporuke za ljude su potrebne daljnje eksperimentalne procjene praćene opsežnim epidemiološkim istraživanjima u ispitanicima. To smo do sada dijelom učinili, dobivene nalaze prikazali u objavljenim člancima (Brajenović i sur., 2013; Piasek i sur., 2014) i u tom području nastavljamo dalje istraživati.

## 6. ZAKLJUČCI

Rezultati istraživanja učinaka kadmija u pokusnih štakorica peroralno izloženih dozi od 50 mg Cd/l tekućinom za napajanje (6,5 mg Cd/kg tjelesne mase na dan) tijekom gotovo cijele skotnosti, od 1. do 19. ili 20. dana graviditeta, na razdiobu kadmija i stanje esencijalnih mikroelemenata u majčinih organima i fetusu te na funkcije posteljice u prijenosu nutrijenata i sintezi steroidnih hormona se mogu sažeti kako slijedi.

Pri dozi kadmija i uvjetima izloženosti primijenjenima u ovom istraživanju, za koja su do sada opisani mogući perinatalni, reprodukcijski i drugi toksični učinci, ovim je istraživanjem utvrđeno:

- **Nema općih toksičnih učinaka u majčinom organizmu i fetotoksičnih učinaka na plod *in utero*;**
- U svim izloženim štakoricama su **višestruko povećane koncentracije kadmija u krvi i količine kadmija u unutrašnjim organima**. U izloženih skotnih štakorica su **povećane količine kadmija u posteljici i fetusu, a koncentracije kadmija u krvi i količine kadmija u jetri i bubrezima su veće nego u izloženih neskotnih štakorica;**
- U svim izloženim štakoricama je **povećan cink u jetri**, a u izloženih skotnih štakorica su **smanjene količine cinka i bakra u bubregu**. U svih skotnih štakorica je smanjen bakar u jetri i povećan bakar u bubregu bez obzira na izloženost kadmiju;
- U svim izloženim štakoricama je **smanjeno željezo u jetri i bubregu** što je **izraženije u izloženih skotnih nego izloženih neskotnih štakorica**. Željezo i hematokrit su smanjeni u svih skotnih štakorica u odnosu na neskotne bez obzira na izloženost kadmiju;
- **Smanjene su količine željeza u fetusu i cinka u posteljici i/ili fetusu;**
- **Nema promjena u količinama progesterona i testosterona u posteljici i njihovim koncentracijama u serumu neposredno prije okoćenja.**

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da u istraživanim uvjetima izloženosti kadmiju tijekom skotnosti u dozi od 50 mg/l *per os* u vodi za piće *ad libitum* nastaje:

- **povećano nakupljanje kadmija u unutrašnjim organima buduće majke i u posteljici** uz istodobne **biokemijske promjene u esencijalnim elementima** u unutrašnjim organima štakorice (zadržavanje cinka u jetri, smanjenja količina cinka i bakra u bubregu i željeza u jetri i bubregu) što je **jače izraženo tijekom skotnosti** nego u istoj dobnoj skupini neskotnih štakorica pod jednakim uvjetima izloženosti;
- **poremećaj funkcije posteljice u prijenosu esencijalnih mikroelemenata** iz majčinog organizma do fetusa koji istodobno s biokemijskim promjenama u stanju esencijalnih elemenata u organima buduće majke **smanjuje prijenos mikronutrijenata u fetus** s mogućim opasnostima za održanje, rast i razvoj ploda *in utero*;
- **nema promjena u količinama posteljičnih steroidnih hormona progesterona i testosterona** kao ni i u njihovim koncentracijama u serumu blizu roka okoćenja što pokazuje da nije poremećena funkcija posteljice štakorice u sintezi steroidnih hormona.

Ovim istraživanjem su prvi puta dobiveni nalazi o količinama progesterona i testosterona u posteljici pokusne štakorice blizu roka okoćenja primjenom modificirane izvorne metode pripreme posteljičnog tkiva za određivanje steroidnih hormona izravno u organu gdje se stvaraju. Za održanje skotnosti štakorice nužni su spolni hormoni koji se stvaraju i u posteljici, i u jajniku, pri čemu je posteljični testosteron prekursor sinteze estradiola u jajniku.

Izvorni znanstveni rezultati istraživanja jesu **dodatni i novi dokazi da se u uvjetima peroralne izloženosti štakorice kadmiju tijekom gotovo cijele skotnosti** pri često rabljenoj dozi od 50 mg Cd/l u vodi za piće *ad libitum* (6,5 mg Cd/kg tjelesne mase na dan u ovom istraživanju), koja ne izaziva opću toksičnost u organizmu buduće majke i služi kao koristan pokusni model neizostavne izloženosti žene u reproduktivnom razdoblju, **remeti funkcija posteljice u prijenosu esencijalnih mikroelemenata u fetus, naročito željeza**. Pored toga je dokazano da dolazi do **biokemijskih promjena u stanju mikronutrijenata u organizmu buduće majke**. Obje vrste poremećaja zajedno mogu smanjiti prijenos mikronutrijenata u fetus i nepovoljno utjecati na njegov rast i razvoj *in utero*. Nepovoljne posljedice mogu preostati i nakon okoćenja u obliku postnatalne anemije i/ili deficijencije cinka na što upućuju prethodna istraživanja pri jednakoj dozi i sličnim uvjetima izloženosti kadmiju u timu gdje je ovaj rad izrađen i rezultati drugih istraživača.

## 7. POPIS KRATICA

ACTH	- adrenokortikotropni hormon ili kortikotropin
C	- odljuštene površne stanice rodničke sluznice bez jezgre ( <i>cornified epithelial cells</i> )
Cd-MT	- kompleks kadmija s ligandom metalotionein
Cu/Zn-SOD	- bakar/cink superoksid dismutaza
CYP11A	- citokromatski enzim koji odcjepljuje bočni lanac kolesterola (P450 <sub>scc</sub> ), kolesterol dezmolaza
CYP17	- citokromatski enzim 17 $\alpha$ -hidroksilaza/17,20-liaza (P450 <sub>c17</sub> )
CYP19	- citokromatski enzim aromataza (P450 arom)
DMT1	- divalentni metalni transporter 1
E	- epitelne poligonalne stanice na površini rodničke sluznice s jezgrom
ED	- endokrina disrupcija
ELISA	- imunokemijska metoda ELISA ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
ET-AAS	- elektrotermička atomska apsorpcijska spektrometrija
ER	- estrogenski receptor
ER $\alpha$	- estrogenski receptor alfa
F-AAS	- plamena atomska apsorpcijska spektrometrija
FPN1	- feroportin 1
IEMA	- imunokemijska metoda IEMA ( <i>immunoenzymometric assay</i> )
L	- leukociti
LH	- luteinizirajući hormon
MT	- metalotionein
MTP1	- metalni transportni protein 1
PTWI	- privremeno prihvatljivi tjedni unos
Tf	- transferin
3 $\beta$ HSD	- 3 beta hidroksisteroidna dehidrogenaza
17HSD	- 17 hidroksisteroidna dehidrogenaza



## 8. LITERATURA

Achanzar WE, Diwan BA, Liu J, Quader ST, Webber MM, Waalkes MP. 2001. *Cancer Res.* **61**: 455-458.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2004. Toxicological Profile for Copper. U.S. Department of health and Human Services, Public Health Service: Atlanta, GA. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=206&tid=37>

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2012. Toxicological Profile for Cadmium. U.S. Department of health and Human Services, Public Health Service: Atlanta, GA. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>

Åkesson A, Berglund M, Schutz A, Bjellerup P, Bremme K, Vahter M. 2002. Cadmium exposure in pregnancy and lactation in relation to iron status. *Am. J. Public Health* **92**: 284-287.

Åkesson A, Julin B, Wolk A. 2008. Long-term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: a population-based prospective cohort study. *Cancer Res.* **68**: 6435-6441.

Ali MM, Murthy RC, Chandra SV. 1986. Developmental and longterm neurobehavioral toxicity of low level in-utero cadmium exposure in rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* **8**: 463-468.

Allen LH. 2000. Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome. *Am. J. Clin Nutr.* **71**: 1280-1284.

Andersen HS, Gambling L, Holtrop G, McArdle HJ. 2007. Effect of dietary copper deficiency on iron metabolism in the pregnant rat. *Br. J. Nutr.* **97**: 239-246.

Andrews GK. 2008. Regulation and function of Zip4, the acrodermatitis enteropathica gene. *Biochem. Soc. Trans.* **36**: 1242-1246.

Arisawa K, Nakano A, Saito H, Liu XJ, Yokoo M, Soda M, Koba T, Takahashi T, Kinoshita K. 2001. Mortality and cancer incidence among a population previously exposed to environmental cadmium. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **74**: 255-262.

Arredondo M, Muñoz P, Mura C, Núñez MT. 2003. DMT1, a physiologically relevant apical Cu 1+ transporter of intestinal cells. *Am. J. Physiol.* **284**, C1525-C1530.

Arredondo M, Núñez MT. 2005. Iron and copper metabolism. *Mol. Asp. Med.* **26**: 313-327.

Bachelet M, Pinot F, Polla RI, François D, Richard MJ, Vayssier-Taussat M, Polla BS. 2002. Toxicity of cadmium in tobacco smoke: protection by antioxidants and chelating resins. *Free Radic. Res.* **36**: 99-106.

Band PR, Le ND, Fang R, Deschamps M. 2002. Carcinogenic and endocrine disrupting effects of cigarette smoke and risk of breast cancer. *Lancet* **360**: 1044-1049.

- Bannon DJ, Abounader R, Lees PS, Bressler JP. 2003. Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **284**: C44-C50.
- Baranski B. 1987. Effect of cadmium on prenatal development and on tissue cadmium, copper, and zinc concentrations in rats. *Environ. Res.* **42**: 54-62.
- Beach RS, Gershwin ME, Hurley LS. 1982. Gestational zinc deprivation in mice: persistence of immunodeficiency for three generations. *Science* **218**: 469-471.
- Beck F. 1981. Comparative placental morphology and function. U: *Developmental Toxicology*, Kimmel CA, Buelke-Sam J (ur). Raven Press: New York; 35-54.
- Begum NA, Kobayashi M, Moriwaki Y, Matsumoto M, Toyoshima K, Seya T. 2002. *Mycobacterium bovis* BCG cell wall and lipopolysaccharide induce a novel gene, *BIGM103*, encoding a 7-TM Protein: identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. *Genomics* **80**: 630-645.
- Bernard A, Lauwerys R. 1986. Effect of cadmium exposure in humans. U: *Cadmium*, Foulkes EC (ur). Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer Verlag; 135-177.
- Bhattacharyya MH, Whelton BD, Peterson DP. 1981. Gastrointestinal absorption of cadmium in mice during gestation and lactation I. Short-term exposure studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **61**: 335-342.
- Bhattacharyya MH, Whelton BD, Peterson DP. 1982. Gastrointestinal absorption of cadmium in mice during gestation and lactation II. Continuous exposure studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **66**: 368-375.
- Bhattacharyya MH, Sellers DA, Peterson DP. 1986. Postlactational changes in cadmium retention in mice orally exposed to cadmium during pregnancy and lactation. *Environ. Res.* **40**: 145-154.
- Bhattacharyya MH. 1991. Cadmium-induced bone loss: increased susceptibility in females. *Water Air Soil Pollut.* **57-58**: 665-673.
- Bhattacharyya MH, Wilson AK, Rajan SS, Jonah M. 2000. Biochemical pathways in cadmium toxicity. U: *Molecular Biology and Toxicology of Metals*, Zalups RK, Koropatnick J (ur). Taylor & Francis, London – New York; 34-74.
- Blanuša M, Breški D. 1981. Comparison of dry and wet ashing procedures for cadmium and iron determination in biological material by atomic-absorption spectrophotometry. *Talanta* **28**: 681-684.
- Blanuša M, Bremner I, Schönwald N, Piasek M, Košiček M, Kostial K. 1993. Influence of maternal iron deficiency and cadmium exposure on trace element status of suckling rats. U: *Trace Elements in Man and Animals – TEMA 8*, Anke M, Meissner D, Mills CF (ur). Verlag Media Touristik: Gersdorf, DE; 955-958.
- Blanuša M, Jureša D. 2001. Lead, cadmium, and mercury dietary intake in Croatia. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **52**: 229-237.

- Blanuša M, Varnai VM, Piasek M, Kostial K. 2005. Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects. *Curr. Med. Chem.* **12**: 2413-2446.
- Blazka ME, Shaikh ZA. 1991. Differences in cadmium and mercury uptakes by hepatocytes: role of calcium channels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **110**: 355-363.
- Brajenović N, Brčić Karačonji I, Mikolić A, Stasenko S, Piasek M. 2013. Tobacco smoke and pregnancy: segmental analysis of nicotine in maternal hair. *Arch. Environ. Occup. Health* **68**: 117-122.
- Brako EE, Wilson AK, Jonah MN, Blum CA, Cerny EA, Williams KL, Bhattacharyya MH. 2003. Cadmium pathways during gestation and lactation in control versus metallothionein 1,2-knockout mice. *Toxicol. Sci.* **71**: 154-163.
- Brandão-Neto J, Stefan V, Mendoça BB, Bloise W, Castro AV. 1995. The essential role of zinc in growth. *Nutr. Res.* **15**: 335-358.
- Bressler JP, Olivi L, Cheong JH, Kim Y, Bannon D. 2004. Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1012**: 142-152.
- Bridges CC, Zalups RK. 2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204**: 274-308.
- Briefel RR, Bialostosky K, Kennedy-Stephenson J, McDowell MA, Ervin RB, Wright JD. 2000. Zinc intake of the U.S. population: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J. Nutr.* **130**: S1367-1373.
- Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem. Toxicol.* **39**: 967-980.
- Brzóska MM, Kamiński M, Supernak-Bobko D, Zwierz K, Moniuszko-Jakoniuk J. 2003. Changes in the structure and function of the kidney of rats chronically exposed to cadmium. I. Biochemical and histopathological studies. *Arch. Toxicol.* **77**: 344-352.
- Cai L, Liu Q, Cherian MG. 2010. Metallothionein and intracellular sequestration of metals. U: *Comprehensive Toxicology*, Second Edition, McQueen CA, Bond J i sur. (ur). Elsevier Ltd.; 501-517.
- Carmichael NG, Backhouse BL, Winder C, Lewis PD. 1982. Teratogenicity, toxicity and perinatal effects of cadmium. *Human Toxicol.* **1**: 159-186.
- Carter AM. 2012. Evolution on placental function in mammals: the molecular basis of gas and nutrient transfer, hormone secretion, and immune responses. *Physiol. Rev.* **92**: 1543-1576.
- Caserta D, Graziano A, Lo Monte G, Bordi G, Moscarini M. 2013. Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17**: 2198-2206.

- Castillo P, Ibáñez F, Guajardo A, Llanos MN, Ronco AM. 2012. Impact of cadmium exposure during pregnancy on hepatic glucocorticoid receptor methylation and expression in rat fetus. *PLoS One* **7**: e44139. doi:10.1371/journal.pone.0044139
- Chan HM, Cherian MG. 1993. Mobilization of hepatic cadmium in pregnant rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **120**: 308-314.
- Chan HM, Tamura Y, Cherian MG, Goyer RA. 1993. Pregnancy-associated changes in plasma metallothionein concentration and renal cadmium accumulation in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **4**: 420-427.
- Chaube S, Nishimura H, Swinyard CA. 1973. Zinc and cadmium in normal human embryos and foetuses: analyses by atomic absorption spectrophotometry. *Arch. Environ. Health* **26**: 237-240.
- Chedrese PJ, Piasek M, Henson MC. 2006. Cadmium as endocrine disruptor in the reproductive system. *Immun. Endoc. Metab. Agents Med. Chem.* **6**: 27-35.
- Cherian MG. 1979. Metabolism of orally administered cadmium-metallothionein in mice. *Environ. Health Perspect.* **28**: 127-130.
- Chmielnicka J, Sowa B. 1996. Cadmium interaction with essential metals (Zn, Cu, Fe), metabolism metallothionein, and ceruloplasmin in pregnant rats and foetuses. *Ecotox. Env. Saf.* **35**: 277-281.
- Choudhury H, Harvery T, Thayer WC, Lockwood TF, Stiteler WM, Goodrum PE, Hassett JM, Diamon GL. 2001. Urinary cadmium elimination as a biomarker of exposure for evaluating a cadmium dietary exposure-biokinetics model. *J. Toxicol. Environ. Health* **63**: 321-350.
- Clarkson TW, Nordberg GF, Sager PR. 1985. Reproductive and developmental toxicity of metals. *Scand. J. Work. Environ. Health* **11**: 145-154.
- Copius Peereboom-Stegeman JHJ, van der Velde WJ, Dessing JWM. 1983. Influence of cadmium on placental structure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **7**: 79-86.
- Couto-Moraes R, Felício LF, Bernardi MM. 2010. Post-partum testosterone administration does not reverse the effects of perinatal exposure to cadmium on rat offspring development. *J. Appl. Toxicol.* **30**: 233-241.
- Couto-Moraes R, Felício LF, Alvarenga de Oliveira C, Bernardi MM. 2012. Post-partum testosterone administration partially reverses the effects of perinatal cadmium exposure on sexual behaviour in rats. *Psychol. Neurosci.* **5**: 221-229.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 627-647.
- Cragg RA, Christie GR, Phillips SR, Russi RM, Kury S, Mathers JC, Taylor PM, Ford D. 2001. A novel zinc-regulated human zinc transporter, hZTL1, is localized to the enterocytes apical membrane. *J. Biol. Chem.* **277**: 22789-22797.

Cumbrowski J, Auermann E. 1980. Beitrag zum Kadmiumgehalt von Neugeborenen [Cadmium content of newborn infants, na njemačkom]. *Z. Gesamte Hyg.* **26**: 345-346.

Dencker L, Danielsson B, Khayat A, Lindgren A. 1983. Disposition of metals in embryo and fetus. U: *Reproductive and Developmental Toxicity of Metals*, Clarkson TW, Nordberg GF, Sager PR (ur). New York – London: Plenum Press; 607-632.

de Rijk EPCT, van Esch E, Flik G. 2002. Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. *Toxicol. Pathol.* **30**: 271-282.

DiDonato M, Sarkar B. 2000. Metal transport and metabolism. U: *Molecular Biology and Toxicology of Metals*, Zalups RK, Koropatnick J (ur). Taylor & Francis, London – New York; 150-178.

di Sant' Agnese PA, Jensen KD, Levin AA, Miller RK. 1983. Placental toxicity of cadmium in the rat: an ultrastructural study. *Placenta* **4**:149-163.

Duančić V. 1972. Osnove embriologije čovjeka. Medicinska knjiga: Zagreb.

Duffy JY, Miller CM, Rutschilling GL, Ridder GM, Clegg MS, Keen CL, Daston GP. 2001. A decrease in intracellular zinc level precedes the detection of early indicators of apoptosis in HL-60 cells. *Apoptosis* **6**: 161-172.

Ekman P. 1999. Genetic and environmental factors in prostate cancer genesis: identifying high-risk cohorts. *Eur. Urol.* **35**: 362-369.

Elinder C-G. 1986. Other toxic effects. U: *Cd and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal*. Volume I. Friberg L, Elinder C-G, Nordberg GF (ur). CRC Press: Boca Raton, FL; 159-204.

Elisma F, Jumarie C. 2001. Evidence for cadmium uptake through Nramp2: metal speciation studies with Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **20**: 662-668.

Ellingsen DG, Horn N, Aaseth J. 2007. Copper. U: *Handbook on the Toxicology of Metals*, Third Edition. Nordberg GF, Fowler BF, Nordberg M, Friberg LT (ur). Academic Press: New York; 529-546.

Elsenhans B, Strugala GJ, Schafer SG. 1997. Small-intestinal absorption of cadmium and the significance of mucosal metallothionein. *Hum. Exp. Toxicol.* **16**: 429-434.

Esteban-Vasallo MD, Aragonés N, Pollan M, López-Abente G, Perez-Gomez B. 2012. Mercury, cadmium, and lead levels in human placenta: a systematic review. *Environ. Health Perspect.* **120**: 1369-1377.

European Food Safety Authority (EFSA). 2012. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal* **10**: 2551, 37 str., doi:10.2903/j.efsa.2012.2551.

Falchuk KH, Montorzi M. 2001. Zinc physiology and biochemistry in oocytes and embryos. *Biometals* **14**: 385-395.

- Felley-Bosco E, Diezi J. 1992. Dietary calcium restriction enhances cadmium-induced metallothionein synthesis in rats. *Toxicol. Lett.* **60**: 139-144.
- Ferguson EL, Gibson RS, Thompson LU, Ounpuu S. 1989. Dietary calcium, phytate, and zinc intakes and the calcium, phytate, and zinc molar ratios of the diets of a selected group of East African children. *Am. J. Clin. Nutr.* **50**: 1450-1456.
- Formigari A, Irato P, Santon A. 2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comp. Biochem. Phys. C* **146**: 443-459.
- Foulkes EC. 1985. Interactions between metals in rat jejunum: implications on the nature of cadmium uptake. *Toxicology* **37**: 117-125.
- Foulkes EC (ur). 1986. *Cadmium*. Berlin–Heidelberg–New York–Tokyo: Springer Verlag; 135-177.
- Foulkes EC, McMullen DM. 1987. Kinetics of transepithelial movement of heavy metals in rat jejunum. *Am. J. Physiol.* **253**: G134-G138.
- Foulkes EC. 1988. On the mechanism of transfer of heavy metals across cell membranes. *Toxicology* **52**: 263-272.
- Foulkes EC. 1989. On the mechanism of cellular cadmium uptake. *Biol. Trace Elem. Res.* **21**: 195-200.
- Foulkes EC, Bergman D. 1993. Inorganic mercury absorption in mature and immature rat jejunum: transcellular and intercellular pathways in vivo and in everted sacs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **120**: 89-95.
- Foulkes EC. 2000. Transport of toxic heavy metals across cell membranes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **223**: 234-240.
- Fox RR, Laird CW. 1970. Sexual cycles. U: *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*, Hafez ESE (ur). Lea and Febinger: Philadelphia, PA; 116-117.
- Friberg L. 1950. Health hazards in the manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning. *Acta Med. Scand.* **138**: 240-257.
- Friberg L, Piscator M, Nordberg M, Nordberg GF, Kjellstrom T. 1974. Cadmium in the environment, CRC Press: Cleveland, OH.
- Friedman PA, Gesek FA. 1994. Cadmium uptake by kidney distal convoluted tubule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **128**: 257–263.
- Fujishiro H, Okugaki S, Kubota K, Fujiyama T, Miyataka H, Himeno S. 2009. The role of ZIP8 down-regulation in cadmium-resistant metallothionein-null cells. *J. Appl. Toxicol.* **29**: 367-373.

- Fukada T, Kambe T. 2011. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics* **3**: 662-674.
- Fung EB, Ritchie LD, Woodhouse LR, Roehi R, King JC. 1997. Zinc absorption in women during pregnancy and lactation: a longitudinal study. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**: 80-88.
- Furukawa S, Hayashi S, Usuda K, Abe M, Hagio S, Ogawa I. 2011. Toxicological pathology in the rat placenta. *J. Toxicol. Pathol.* **24**: 95-111.
- Gaetke LM, Chow CK. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* **189**: 147-163.
- Gallagher ML. 2008. The nutrients and their metabolism. U: *Krause's Food & Nutrition Therapy*, Edition 12. Mahan KL, Escott-Stump S (ur). Elsevier Saunders: St. Louis, MO; 118-124.
- Gambling L, Danzeisen R, Gair S, Lea RG, Charania Z, Solanky N, Joory KD, Srai SKS, McArdle HJ. 2001. Effect of iron deficiency on placental transfer of iron and expression of iron transport proteins *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.* **356**: 883-889.
- Gambling L, Charania Z, Hannah L, Antipatis C, Lea RG, McArdle HJ. 2002. Effect of iron deficiency on placental cytokine expression and fetal growth in the pregnant rat. *Biol. Reprod.* **66**: 516-523.
- Gambling L, Danzeisen R, Fosset C, Andersen HS, Dunford S, Srai KS, McArdle HJ. 2003. Iron and copper interactions in development and the effect on pregnancy outcome. *J. Nutr.* (suppl.): 1554S.
- Gambling L, Dunford S, McArdle HJ. 2004. Iron deficiency in the pregnant rat has differential effects on maternal and fetal copper levels. *J. Nutr. Biochem.* **15**: 366-372.
- Gambling L, Czopek A, Andersen HS, Holtrop G, Srai SKS, Krejpcio Z, McArdle HJ. 2009. Fetal iron status regulates maternal iron metabolism during pregnancy in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296**: 1063-1070.
- Gambling L, Kennedy C, McArdle HJ. 2011. Iron and copper in fetal development. *Semin Cell Dev. Biol.* **22**: 637-644.
- Garcia-Morales P, Saceda M, Kenney N, Salomon DS, Kim N, Salomon DS, Gottardis MM, Solomon HB, Sholler PF, Jordan VC, Martin MB. 1994. Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 16896-16901.
- Ginsberg GL. 2012. Cadmium risk assessment in relation to background risk of chronic kidney disease. *J. Toxicol. Environ. Health A* **75**: 374-390.
- Girijashanker K, He L, Soleimani M, Reed JM, Li H, Liu Z, Wang B, Dalton TP, Nebert DW. 2008. Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter. *Mol. Pharmacol.* **73**: 1413-1423.

- Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg DA. 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J. Occup. Med. Toxicol.* **1**: 22.
- Goodman MH. 2009. *Basic medical endocrinology*, Fourth Edition. Academic Press/Elsevier Science & Technology Books: Amsterdam–Boston–Heidelberg–London.
- Goyer RA, Miller CR, Zhu SY, Victory W. 1989. Non-metallothionein bound cadmium in the pathogenesis of cadmium nephropathy in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **101**: 232-244.
- Goyer RA. 1995. Transplacental transfer of lead and cadmium. U: *Toxicology of Metals, Biochemical Aspects*, Handbook of Experimental Pharmacology, Volume 115. Goyer RA, Cherian MG (ur). Springer Verlag: Berlin – Heidelberg; 1-17.
- Goyer RA, Liu J, Waalkes MP. 2004. Cadmium and cancer of prostate and testis. *Biometals* **17**: 555-558.
- Groten JP, Sinkeldam EJ, Luten JB, van Bladeren PJ. 1991. Cadmium accumulation and metallothionein concentrations after 4-week dietary exposure to cadmium chloride or cadmium-metallothionein in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **111**: 504-513.
- Groten JP, Luten JB, van Bladeren PJ. 1992. Dietary iron lowers the intestinal uptake of cadmium-metallothionein in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **228**: 23-28.
- Guiet-Bara A, Bara M, Durlach J. 1991. Toxic metals and human amniotic ion permeability. II. Ultrastructural study and relationship with magnesium. *Magnes. Res.* **4**: 77-81.
- Gun SA, Gould TC. 1970. Cd and other mineral elements. U: *The testis. Vol. III Influencing factors*, Johnson AD, Gomes WR, Vademark NL (ur). Academic Press: New York; 377-481.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**: 482-488.
- Gunshin H, Fujiwara Y, Custodio AO, DiRenzo C, Robine S, Andrews NC. 2005. Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J. Clin. Invest.* **115**: 1258-1266.
- Gupta A, Gupta A, Murthy RC, Chandra SV. 1993. Neurochemical changes in developing rat brain after pre- and postnatal cadmium exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **51**: 12-17.
- Hardman B, Manuelpillai U, Wallace EM, van de Waasenburg S, Cater M, Mercer JF, Ackland ML. 2004. Expression and localization of Menkes and Wilson copper transporting ATPases in human placenta. *Placenta* **25**: 512-517.
- Hardman B, Michalczyk A, Greenough M, Camakaris J, Mercer JF, Ackland ML. 2007. Hormonal regulation of the Menkes and Wilson copper-transporting ATPases in human placental Jeg-3 cells. *Biochem. J.* **402**: 241-250.



He L, Girijashanker K, Dalton TP, Reed J, Li H, Soleimani M, Nebert DW. 2006. ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties. *Mol. Pharmacol.* **70**: 171-180.

Hendrickx AG, Houston ML. 1970. Gestation and prenatal development. U: *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*, Hafez ESE (ur). Lea and Febinger: Philadelphia, PA; 157-176.

Henson MC, Chedrese PJ. 2004. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp. Biol. Med.* **229**: 383-392.

Henson MC, Piasek M, Chedrese PJ, Castracane VD. 2010. Metal toxicity in mammalian reproduction. U: *Endocrine Toxicology*, Third Edition. Target Organ Toxicology Series. Eldridge JC, Stevens JT (ur). Informa Healthcare: New York; 256-279.

Hinkle PM, Kinsella PA, Osterhoudt KC. 1987. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J. Biol. Chem.* **262**: 16333-16337.

Hojyo S, Fukada T, Shimoda S, Ohashi W, Bin BH, Koseki H, Hirano T. 2011. The zinc transporter SLC39A14/ZIP14 controls G-protein coupled receptor-mediated signalling required for systemic growth. *PLoS One* **6**: e18059.

Hu J, Mao Y, White K and Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. 2002. Renal cell carcinoma and occupational exposure to chemicals in Canada. *Occup. Med.* **52**: 157-164.

Hurrell R, Egli I. 2010. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**: 1461-1467.

Iavicoli I, Fontana L, Bergamaschi A. 2009. The effects of metals as endocrine disruptors. *J. Toxicol. Environ. Health* **12**: 206-223.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 1993. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. U: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Vol. 58. Lyon, Francuska.

International Register of Potentially Toxic Chemicals (IRPTC). 1987. Geneva, Švicarska: United Nations Environment Programme (UNEP).

Ishitobi H, Watanabe C. 2005. Effects of low-dose perinatal cadmium exposure on tissue zinc and copper concentrations in neonatal mice and on the reproductive development of female offspring. *Toxicol. Lett.* **159**: 38-46.

Jackson JA, Albrecht ED. 1985. The development of placental androstendione and testosterone production and their utilization by the ovary for aromatization to estrogen during rat pregnancy. *Biol. Reprod.* **33**: 451-457.

Järup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. 1998. Health effects of cadmium exposure-a review of the literature and a risk estimate. *Scand. J. Work Environ. Health* **24**: 1-51.

- Järup L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Brit. Med. Bull.* **68**: 167-182.
- Jenkitkasemwong S, Wang CY, Mackenzie B, Knutson MD. 2012. Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP8. *Biometals* **25**: 643-655.
- Jeong SH, Habeebu SSM, Klaassen CD. 2000. Cadmium decreases gap junctional intercellular communications in mouse liver. *Toxicol. Sci.* **57**: 156-166.
- Ji YL, Wang H, Liu P, Zhao XF, Zhang Y, Wang Q, Zhang H, Zhang C, Duan ZH, Meng C, Xu DX. 2011. Effects of maternal cadmium exposure during late pregnant period on testicular steroidogenesis in male offspring. *Toxicol. Lett.* **205**: 69-78.
- Jin T, Nordberg M, Frech W, Dumont X, Bernard A, Ye TT, Kong Q, Wang Z, Li P, Lundstrom NG, Li Y, Nordberg GF. 2002. Cadmium biomonitoring and renal dysfunction among a population environmentally exposed to cadmium from smelting in China (China Cad). *Biometals* **15**: 397-410.
- Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, Al-Refai H, Taylor JA, Kunkel TA, Resnick MA, Gordenin DA. 2003. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat. Genet.* **34**: 326-329.
- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S, Martin MB. 2003. Cadmium mimics the *in vivo* effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat. Med.* **9**: 1081-1084.
- Johri N, Jacquillet G, Unwin R. 2010. Heavy metal poisoning: The effects of cadmium on the kidney. *Biometals* **23**: 783-792.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2001. Zinc. U: *Human Vitamin and Mineral Requirements*. Report of a joint FAO/WHO expert consultation Bangkok, Thailand; 257-270.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2004. Annexes: Cadmium. U: *Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*. WHO Food Additives Series No. 52; 505-563.
- Jolibois LS Jr, Shi W, George WJ, Henson MC, Anderson MB. 1999a. Cadmium accumulation and effects on progesterone release by cultured human trophoblast cells. *Reprod. Toxicol.* **13**: 215-221.
- Jolibois LS Jr, Burow ME, Swan KF, George WJ, Anderson MB, Henson MC. 1999b. Effects of cadmium on cell viability, trophoblastic development, and expression of low density lipoprotein receptor transcripts in cultured human placental cells. *Reprod. Toxicol.* **13**: 473-480.
- Jurasović J, Telišman S. 1993. Determination of lead and cadmium in human seminal fluid by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **8**: 419-425.
- Jureša D, Blanuša M. 2003. Mercury, arsenic, lead and cadmium in fish and shellfish from the Adriatic Sea. *Food Addit. Contam.* **20**: 241-246.

Kamenczak A, Pokorska M, Wolek E, Kobylecka K. 1990. Acute zinteral oral poisoning. *Pol. Tyg. Lek.* **45**: 1010-1012.

Katić (Mikolić) A, Piasek M, Lazarus M, Kljaković-Gašpić Z, Jurasović J. 2008. Effects of oral cadmium exposure during pregnancy on maternal and foetal element distribution and steroidogenesis in rats. *Toxicol. Lett.* **180** (Suppl 1): S55.

Kawai M, Swan KF, Green AE, Edwards DE, Anderson MB, Henson MC. 2002. Placental endocrine disruption induced by cadmium: effects on P450 cholesterol side-chain cleavage and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in cultured human trophoblasts. *Biol. Reprod.* **67**: 178-183.

Kazantzis G, Lam TH, Sullivan KR. 1988. Mortality of cadmium-exposed workers. A five-year update. *Scand. J. Work Environ. Health* **14**: 220-223.

Keen CL. 1996. Teratogenic effects of essential trace metals: deficiencies and excesses. U: *Toxicology of Metals*, Chang L, Magos L, Suzuki T (ur). CRC Press: New York; 977-1001.

Keen CL, Hanna LA, Lanoue L, Uriu-Adams JY, Rucker RB, Clegg MS. 2003. Developmental consequences of trace mineral deficiencies in rodents: acute and long-term effects. *J. Nutr.* **133**: 1477S-1480S.

Kelman BJ, Walter BK, Jarboe GE, Sasser LB. 1978. Effect of dietary cadmium on calcium metabolism in the rat during late gestation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **158**: 614-617.

Kido T, Shaikh ZA, Kito H 1991. Dose-response relationship between urinary cadmium and metallothionein in a Japanese population environmentally exposed to cadmium. *Toxicology* **65**: 323-332.

Kim DW, Kim KY, Choi BS, Youn P, Ryu DY, Klaassen CD, Park JD. 2007. Regulation of metal transporters by dietary iron, and the relationship between body iron levels and cadmium uptake. *Arch. Toxicol.* **81**: 327-334.

Kimura T, Itoh N, Min KS, Fujita I, Muto N, Tanaka K. 1998. Tissue accumulation of cadmium following oral administration to metallothionein-null mice. *Toxicol. Lett.* **99**: 85-90.

Kipling MD, Waterhouse JAH. 1967. Cadmium and prostatic carcinoma. *Lancet* **289**: 730-731.

Kippler M, Ekström EC, Lönnerdal B, Goessler W, Akesson A, El Arifeen S, Persson LA, Vahter M. 2007. Influence of iron and zinc status on cadmium accumulation in Bangladeshi women. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **222**: 221-226.

Kippler M, Goessler W, Nermell B, Ekström EC, Lönnerdal B, El Arifeen S, Vahter M. 2009. Factors influencing intestinal cadmium uptake in pregnant Bangladeshi women – a prospective cohort study. *Environ. Res.* **109**: 914-921.

Kippler M, Waheedul Hoque AM, Raqib R, Öhrvik H, Ekström EC, Vahter M. 2010. Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus. *Toxicol. Lett.* **192**: 162-168.

Kjellstrom T, Evrin PE, Rahnster B. 1977. Dose-response analysis of cadmium-induced tubular proteinuria: a study of urinary  $\beta_2$ -microglobulin excretion among workers in a battery factory. *Environ. Res.* **13**: 303-317.

Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**: 267-294.

Kolonel LN. 1976. Association of cadmium with renal cancer. *Cancer* **37**: 1782-1787.

Kostial K. 1986. Cadmium. U: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. Fifth Edition, Vol. 2. Mertz W (ur). Academic Press, Inc.: Orlando, FL; 319-345.

Kostial K, Blanuša M, Schönwald N, Arežina R, Piasek M, Jones MM, Singh PK. 1993. Organ cadmium deposits in orally exposed female rats and their pups and the depleting efficiency of sodium *N*-(4-Methoxybenzyl)-D-glucamine-*N*-carbodithioate monohydrate (MeOBDCG). *J. Appl. Toxicol.* **13**: 203-207.

Krebs NF. 2000. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J. Nutr.* **130**: S1374-1377.

Kriegel AM, Soliman AS, Zhang Q, El-Ghawalby N, Ezzat F, Soultan A, Abdel-Wahab M, Fathy O, Ebidi G, Bassiouni N, Hamilton SR, Abbruzzo JL, Lacey MR, Blake DA. 2006. Serum cadmium levels in pancreatic cancer patients from the East Nile Delta region in Egypt. *Environ. Health Perspect.* **114**: 113-119.

Kuriwaki J, Nishijo M, Honda R, Tawara K, Nakagawa H, Hori E, Nishijo H. 2005. Effects of cadmium exposure during pregnancy on trace elements in fetal rat liver and kidney. *Toxicol. Lett.* **156**: 369-376.

Lafuente A, Cano P, Esquifino AI. 2003. Are cadmium effects on plasma gonadotropins, prolactin, ACTH, GH and TSH level, dose dependent? *Biometals* **16**: 243-250.

Lamprecht SA, Lipkin M. 2003. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **3**: 601-614.

Laskey JW, Rehnberg GL, Laws SC, Hein JF. 1984. Reproductive effects of low acute doses of Cd chloride in adult male rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **73**: 250-255.

Lauwerys RR, Buchet JP, Roels HA, Brouwers J, Stanescu D. 1974. Epidemiological survey of workers exposed to cadmium. *Arch. Environ. Health* **28**: 145-148.

Leazer TM, Liu Y, Klaasen CD. 2002. Cadmium absorption and its relationship to divalent metal transporter-1 in the pregnant rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **185**: 18-24.

Lee J, Prohaska JR, Thiele DJ. 2001. Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 6842-6847.

Levin AA, Miller RK. 1981. Fetal toxicity of cadmium in the rat: Decreased utero-placental blood flow. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **58**: 297-306.

- Levin AA, Miller RK, di Sant'Agnese PA. 1983. Heavy metal alterations of placental function: a mechanism for the induction of fetal toxicity in cadmium. U: *Reproductive and Developmental Toxicity of Metals*, Clarkson TW, Nordberg GF, Sager PR (ur). Plenum Press: New York – London; 633-654.
- Levin AA, Kilpper RW, Miller RK. 1987. Fetal toxicity of cadmium chloride: the pharmacokinetics in the pregnant Wistar rat. *Teratology* **36**: 163-170.
- Linder MC, Hazegh-Azam M 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**: 797S-811S.
- Liu J, Klaassen CD. 1996. Absorption and distribution of cadmium in metallothionein-I transgenic mice. *Fund. Appl. Toxicol.* **29**: 294-300.
- Liu J, Corton C, Dix DJ, Liu Y, Waalkes MP, Klaassen CD. 2001a. Genetic background but not metallothionein phenotype dictates sensitivity to cadmium-induced testicular injury in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **176**: 1-9.
- Liu YP, Liu J, Klaassen CD. 2001b. Metallothionein-null and wild-type mice show similar cadmium absorption and tissue distribution following oral cadmium administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **175**: 253-259.
- Lönnerdal B. 2000. Dietary factors influencing zinc absorption. *J. Nutr.* **130**: 1378S-1383S.
- Lozoff B, Georgieff M. 2006. Iron deficiency and brain development. *Semin. Pediatr. Neonatol.* **13**: 158-165.
- Magos L, Webb M. 1983. The influence of weight and others physiological changes during pregnancy and lactation on the toxicity of mercury and cadmium. U: *Reproductive and Developmental Toxicity of Metals*, Clarkson TW, Nordberg GF, Sager PR (ur). Plenum Press: New York – London; 417-436.
- Mahan KL, Escott-Stump S. 2008. *Krause's Food & Nutrition Therapy*, Edition 12, Saunders, Elsevier: St. Louis, MO.
- Mandel JS, McLaughlin JK, Schlehofer B, Møller A, Helmer U, Lindblad P, McCredie M, Adami HO. 1995. International renal-cell cancer study. IV. *Occupation. Int. J. Cancer* **61**: 601-605.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* **62**: 609-614.
- Maret W. 2004. Exploring the zinc proteome. *J. Anal. At. Spectrom.* **19**: 15-19.
- Maret W, Sandstead HH. 2006. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J. Trace. Elem. Med. Bio.* **20**, 3-18.
- Martelli A, Rousselet E, Dycke C, Bouron A, Moulis JM. 2006. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* **88**: 1807-1814.

Martin MB, Voeller HJ, Gelmann EP, Lu J, Stoica EG, Hebert EJ, Reiter R, Singh B, Danielsen M, Pentecost E, Stoica A. 2002. Role of Cd in the regulation of AR gene expression and activity. *Endocrinology* **143**: 263-275.

Martin BM, Reiter R, Pham T, Avellanet YR, Camara J, Lahm M, Pentecost E, Pratap K, Gilmore BA, Diverakar S, Dagata RS, Bull JL, Stoica A. 2003. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* **144**: 2425-2436.

Massanyi P, Uhrin V, Sirotkin AV, Paksy K, Forgacs ZS, Toman R, Kovacik J. 2000. Effects of cadmium on ultrastructure and steroidogenesis in cultured porcine ovarian granulosa cells. *Acta Vet. (Brno)* **69**: 101-106.

Matek M, Blanuša M. 1998. Comparison of two methods for destruction of biological material for determination of selenium. *Arh. Hig. Rada Toksiol.* **49**: 301-305.

Matt DW, Macdonald GJ. 1984. *In vitro* progesterone and testosterone production by the rat placenta during pregnancy. *Endocrinology* **115**: 741-747.

McArdle HJ, Andersen HS, Jones H, Gambling L. 2008. Copper and iron transport across the placenta: regulation and interactions. *J. Neuroendocrinol.* **20**: 427-431.

McElroy JA, Shafer MM, Trentham-Dietz A, Hampton JM, Newcomb PA. 2006. Cadmium exposure and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**: 869-873.

Merck Manual. 2012. Health Care Professionals>Gynecology and Obstetrics>Approach to the Pregnant Woman and Prenatal Care: *Physiology of pregnancy*.  
[http://www.merckmanuals.com/professional/gynecology\\_and\\_obstetrics/approach\\_to\\_the\\_pregnant\\_woman\\_and\\_prenatal\\_care/physiology\\_of\\_pregnancy.html?qt=Physiology%20of%20pregnancy&alt=sh](http://www.merckmanuals.com/professional/gynecology_and_obstetrics/approach_to_the_pregnant_woman_and_prenatal_care/physiology_of_pregnancy.html?qt=Physiology%20of%20pregnancy&alt=sh)

Mikolić A, Piasek M. 2010. Oral cadmium exposure and placental steroidogenesis in rats. *Toxicol. Lett.* **196** (Suppl 1): S302.

Mikolić A, Piasek M, Sulimanec Grgec A, Varnai VM, Stasenko S, Kralik Oguić S. 2014. Oral cadmium exposure during rat pregnancy: assessment of transplacental micronutrient transport and steroidogenesis at term. *J. Appl. Toxicol.* doi:10.1002/jat.3055.

Miller WL, Auchus RJ. 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr. Rev.* **32**: 81-151.

Min KS, Kobayashi K, Onosaka S, Ohta N, Okada Y, Tanaka K. 1986. Tissue distribution of cadmium and nephropathy after administration of cadmium in several chemical forms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **86**: 262-270.

Mitane Y, Tohyama C, Saito H. 1986. The role of metallothionein on the elevated excretion of copper in urine from people living in a cadmium-polluted area. *Fundam. Appl. Toxicol.* **6**: 285-291.

Nakamura K, Yasunaga Y, Ko D, Xu LL, Moul JW, Peehl DM, Srivastava S, Rhim JS. 2002. Cadmium-induced neoplastic transformation of human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* **20**: 543-547.

Nakamura Y, Ohba K, Suzuki K, Ohta H. 2012. Health effects of low-level cadmium intake and the role of metallothionein on cadmium transport from mother rats to fetus. *J. Toxicol. Sci.* **37**: 149-156.

Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L, Vangronsveld J, Van Hecke E, Staessen JA. 2006. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *Lancet Oncol.* **7**: 119-126.

National Institute of Environmental Health Sciences and the National Toxicology Program (NIEHS/ NTP). 2010. Endocrine disruptors.  
[http://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine\\_disruptors\\_508.pdf](http://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine_disruptors_508.pdf)

Nishijo M, Nakagawa H, Morikawa Y, Tabata M, Senma M, Miura K, Takahara H, Kawano S, Nishi M, Mizukoshi K, et al. 1995. Mortality of inhabitants in an area polluted by cadmium: 15 year follow up. *Occup. Environ. Med.* **52**: 181-184.

Nordberg GF, Jin T, Bernard A, Fierens S, Buchet JP, Ye T, Kong Q, Wang H. 2002. Low bone density and renal dysfunction following environmental cadmium exposure in China. *Ambio* **31**: 478-481.

Nordberg GF, Nogawa K, Nordberg M, Friberg LT. 2007. Cadmium. U: *Handbook on the Toxicology of Metals*, Third Edition. Nordberg GF, Fowler BF, Nordberg M, Friberg LT (ur). Academic Press: New York; 445-486.

Nordberg GF. 2009. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238**: 192-200.

Novelli ELB, Vieira EP, Rodrigues NL, Ribas BO. 1998. Risk assessment of cadmium toxicity on hepatic and renal tissues of rats. *Environ. Res.* **79**: 102-105.

Oberdorster G, Guth DJ, Lee YH, Mavis RD. 1985. Lung toxicity of cadmium: importance of its chemical form. U: *Heavy Metals in the Environment*, Lekkas TD (ur). Edinburgh: CEP Consultants Ltd.; **1**: 571-574.

Ohta H, Cherian MG. 1991. Gastrointestinal absorption of cadmium and metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **107**: 63-72.

Oishi S, Nakagawa J, Ando M. 2000. Effects of cadmium administration on the endogenous metal balance in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **76**: 257-278.

Örhvik H, Tydén E, Artursson P, Oskarsson A, Tallkvist J. 2013. Cadmium transport in a model of neonatal intestinal cells correlates to MRP1 and not DMT1 or FPN1. *ISRN Toxicol.* 2013: Article ID 892364, 9 str., doi:10.1155/2013/892364.

Oteiza P I, Clegg M S, Zago M P, Keen C L. 2000. Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radic. Biol. Med.* **28**: 1091–1099.

Paksy K, Varga B, Lázár P. 1992. Cadmium interferes with steroid biosynthesis in rat granulosa and luteal cells *in vitro*. *Biometals* **5**: 245-250.

Paksy K, Varga B, Lázár P. 1996. Zinc protection against cadmium-induced infertility in female rats. Effect of zinc and cadmium on the progesterone production of cultured granulosa cells. *Biometals* **10**: 27-36.

Paksy K, Rajczy K, Forgács Z, Lázár P, Bernard A, Gáti I, Kaáli GS. 1997. Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. *J. Appl. Toxicol.* **17**: 321-327.

Pan J, Plant JA, Voulvoulis N, Oates CJ, Ihlenfeld C. 2010. Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environ. Geochem. Health* **32**: 1-12.

Pařízek J. 1964. Vascular changes at sites of oestrogen biosynthesis produced by parenteral injection of cadmium salts: the destruction of placenta by cadmium salts. *J. Reprod. Fertil.* **7**: 263-265.

Pařízek J. 1983. Cadmium and reproduction: a perspective after 25 years. U: *Reproductive and Developmental Toxicity of Metals*, Clarkson TW, Nordberg GF, Sager PR (ur). Plenum Press: New York – London; 301-313.

Park JD, Cherrington NJ, Klaassen CD. 2002. Intestinal absorption of cadmium is associated with divalent metal transporter 1 in rats. *Toxicol. Sci.* **68**: 288-294.

Pasqualiny JR, Kinel FA. 1985. *Hormones and the Fetus. Vol. I: Production, Concentration, and Metabolism during Pregnancy*. Pergamon Press: Oxford, UK.

Payne AH, Hales DB. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.* **25**: 947-970.

Pesch B, Haerting J, Ranft U, Klimpel A, Oelschlagel B, Schill W. 2000. Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicentre urothelial and renal cancer study. *Int. J. Epidemiol.* **29**: 1014-1024.

Petering HG, Choudhury H, Stemmer KL. 1979. Some effects of oral ingestion of cadmium on zinc, copper and iron metabolism. *Environ. Health Perspect.* **28**: 97-106.

Piasek M, Laskey JW. 1994. Acute cadmium exposure and ovarian steroidogenesis in cycling and pregnant rats. *Reprod. Toxicol.* **8**: 495-507.

Piasek M, Schönwald N, Blanuša M, Kostial K, 1996a. Effects of prenatal and postnatal exposure to cadmium on element concentration in rats. *Toxicol. Lett.* **99** (Suppl 1): 57-58.

Piasek M, Schönwald N, Blanuša M, Kostial K, Laskey JW. 1996b. Biomarkers of heavy metal reproductive effects and interaction with essential elements in experimental studies on female rats. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **47**: 245-259.



Piasek M, Laskey JW. 1999. Effects of *in vitro* cadmium exposure on ovarian steroidogenesis in rats. *J. Appl. Toxicol.* **19**: 211-217.

Piasek M, Laskey JW, Kostial K, Blanuša M, Ferrel JM. 2000. Low iron diet and cadmium exposure disrupt steroidogenesis in the rats. U: *Trace Elements in Man and Animals 10*, Roussel AM, Anderson RA, Favier AE (ur). Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York; 809-811.

Piasek M, Blanuša M, Kostial K, Laskey JW. 2001. Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers. *Reprod. Toxicol.* **15**: 673-681.

Piasek M, Laskey JW, Kostial K, Blanuša M. 2002. Assessment of steroid disruption using cultures of whole ovary and/or placenta in rat and in human placental tissue. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **75** (Suppl): S36-S44.

Piasek M, Blanuša M, Kostial K, Laskey JW. 2004. Low iron diet and parenteral cadmium exposure in pregnant rats: the effects on trace elements and fetal viability. *Biometals* **17**: 1-14.

Piasek M, Henson MC, Blanuša M, Kostial K. 2007. Assessment of steroid disruption and metal concentrations in human placenta: effects of cigarette smoking. U: *Smoking and Health Research Frontiers*, Fong CB (ur). Nova Science: Hauppague, NY; 119-161.

Piasek M, Mikolić A. 2009. Minerals and physiology-From essentiality to toxicity: a review of important minerals and their major impact on the human body's physiology. U: *Role of Minerals in Food Technology and Nutrition*, Gašperlin L, Žlender B (ur). 26<sup>th</sup> Food Technology Days dedicated to Prof. F. Bitenc. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živalstvo and Slovensko prehransko društvo; 9-19.

Piasek M, Mikolić A, Sekovanić A, Sulimanec Grgec A, Jurasović J. 2014. Cadmium in placenta – a valuable biomarker of exposure during pregnancy in biomedical research. *J. Toxicol. Environ. Health A* **77**: 1-4.

Piscator M. 1976. Health hazards from inhalation of metal fumes. *Envir. Res.* **11**: 268-270.

Pond WG, Walker EF Jr. 1975. Effect of dietary Ca and Cd level of pregnant rats on reproduction and on dam and progeny tissue mineral concentrations. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **148**: 665-668.

Ponka P, Tenenbein M, Eaton JW. 2007. Iron. U: *Handbook on the Toxicology of Metals*, Third Edition. Nordberg GF, Fowler BF, Nordberg M, Friberg LT (ur). Academic Press: New York; 577-598.

Powlin SS, Keng PC, Miller RK. 1997. Toxicity of cadmium in human trophoblast cells (JAR choriocarcinoma): role of calmodulin and the calmodulin inhibitor, zaldaride maleate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **144**: 225-234.

Prasad AS. 1979. Trace elements: Biochemical and clinical effects of zinc and copper. *Am. J. Hematol.* **6**: 77-87.

Prasad AS. 2008. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp. Gerontol.* **43**: 370-377.

Prozialeck WC, Lamar PC. 1999. Interaction of cadmium  $\text{Cd}^{2+}$  with a 13-residue polypeptide analog of a putative calcium-binding motif of E-cadherin. *Biochim. Biophys. Acta* **1451**: 93-100.

Prozialeck WC. 2000. Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **164**: 231-249.

Prozialeck WC, Lamar PC, Lynch SA. 2003. Cadmium alters the localization of N-cadherin, E-cadherin, and beta-catenin in the proximal tubule epithelium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **189**: 180-195.

Ramirez-Cárdenas L, Brunoro Costa NM, Reis FP. 2005. Copper-iron metabolism interaction in rats. *Nutr. Res.* **25**: 79-92.

Rao R, Georgieff M K. 2007. Iron in fetal and neonatal nutrition. *Semin. Fetal Neonat. M.* **12**: 54-63.

Rappaport SM. 2012. Discovering environmental causes of disease. *J. Epidemiol. Community Health* **66**: 99-102.

Roelfzema WH, Roelofsen AM, Herber RF, Peereboom-Steg JH. 1988. Cadmium and zinc concentrations in fetal and maternal rat tissue after parenteral administration of cadmium during pregnancy. *Arch. Toxicol.* **62**: 285-290.

Rogers JM. 2009. Tobacco and pregnancy. *Reprod. Toxicol.* **28**: 152-160.

Ronco AM, Garrido F, Llanos MN. 2006. Smoking specifically induces metallothionein-2 isoform in human placenta at term. *Toxicology* **223**: 46-53.

Ronco AM, Urrutia M, Montenegro M, Llanos MN. 2009. Cadmium exposure during pregnancy reduces birth weight and increases maternal and foetal glucocorticoids. *Toxicol. Lett.* **188**: 186-191.

Ronco AM, Montenegro M, Castillo P, Urrutia M, Saez D, Hirsch S, Zepeda R, Llanos MN. 2011. Maternal exposure to cadmium during gestation perturbs the vascular system of the adult rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **251**: 137-145.

Ryu DY, Lee SJ, Park DW, Choi BS, Klaassen CD, Park JD. 2004. Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats. *Toxicol. Lett.* **152**: 19-25.

Sabolić I, Breljak D, Škarica M, Herak-Kramberger CM. 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals* **23**: 897-926.

Salgueiro MJ, Zubillaga BM, Lysionek A, Sarabia MI, Caro R, De Paoli T, Hager A, Weill R, Boccio J. 2000. Zinc as essential micronutrient: a review. *Nutr. Res.* **20**: 737-755.

Salgueiro MJ, Zubillaga MB, Lysionek AE, Caro RA, Weill R, Boccio JR. 2002. The role of zinc in the growth and development of children. *Nutrition* **18**: 510-519.

Salvatori F, Talassi CB, Salzgeber SA, Spinoso HS, Bernardi MM. 2004. Embryotoxic and long-term effects of cadmium exposure during embryogenesis in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **26**: 673-680.

Samuel JB, Stanley JA, Princess RA, Shanthi P, Sebastian MS. 2011. Gestational cadmium exposure-induced ovotoxicity delays puberty through oxidative stress and impaired steroid hormone levels. *J. Med. Toxicol.* **7**: 195-204.

Sanderson JT. 2009. Placental and fetal steroidogenesis. Chapter 7. U: *Human Embryogenesis: Methods and Protocols*, Vol. 550. Lafond J, Vaillancourt C (ur). Humana Press/Springer; 127-136.

Sandstead HH, Au W. 2007. Zinc. U: *Handbook on the Toxicology of Metals*, Third Edition. Nordberg GF, Fowler BF, Nordberg M, Friberg LT (ur). Academic Press: New York; 925-947.

Satarug S, Moore MR. 2004. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ. Health Perspect.* **112**: 1099-1103.

Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. 2010. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ. Health Perspect.* **118**: 182-190.

Schönmakers TJ, Klaren PH, Flik G, Lock RA, Pang PK, Bonga SE. 1992. Actions of cadmium on basolateral plasma membrane proteins involved in calcium uptake by fish intestine. *J. Membr. Biol.* **127**: 161-172.

Schönwald N. 1993. Učinci prenatalne, perinatalne i postnatalne izloženosti štakora kadmiju. [Magistarski rad]. Sveučilište u Zagrebu, Postdiplomski studij prirodnih znanosti, Biologija–biomedicina: Zagreb, 152 str.

Schönwald N. 1995. Učinci kadmija na zdravlje štakora u uvjetima pomanjkanja željeza odnosno kalcija u hrani. [Doktorski rad]. Sveučilište u Zagrebu, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada: Zagreb, 103 str.

Sekovanić A, Jurasović J, Orct T, Brajenović N, Brčić Karačonji I, Mikolić A, Sulimanec Grgec A, Stasenka A, Piasek M. 2013. Placental cadmium concentration as an indicator of maternal tobacco smoking. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **27** (Suppl): 47.

Sherman AR, Moran PE. 1984. Copper metabolism in iron-defficient maternal and neonatal rats. *J. Nutr.* **114**: 298-306.

Singla PN, Gupta VK, Agarwal KN. 1985. Storage iron in human foetal organs. *Acta. Pediatr. Scand.* **74**: 701-706.

Smida AD, Velderrama XP, Agostini MC, Furlan MA, Chedrese J. 2004. Cadmium stimulates transcription of the cytochrome P450 side chain cleavage gene in genetically modified stable porcine granulosa cells. *Biol. Reprod.* **70**: 25-31.

Solomon S. 1988. The placenta as an endocrine organ: steroids. U: *The Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill JD (ur). Raven Press, Ltd.: New York; 2085-2091.

Sorell TL, Graziano JH. 1990. Effect of oral cadmium exposure during pregnancy on maternal and fetal zinc metabolism in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **102**: 537-545.

Sorkun HC, Bir F, Akbulut M, Divrikli U, Erken G, Demirhan H, Duzcan E, Elci L, Celik I, Yozgatli U. 2007. The effects of air pollution and smoking on placental cadmium, zinc concentration and metallothionein expression. *Toxicology* **238**: 15-22.

Souza V, Bucio L, Gutierrez-Ruiz MC. 1997. Cadmium uptake by a human hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* **120**: 215-220.

Sovet. 1858. [Poisoning caused by powder used in the cleaning of silver: severe symptoms: acute gastroenteritis; dysentery episodes; antidotes; antiinflammatory products; ipecac; chemical analysis, na francuskom]. *Presse. Med. Belge* **10**: 69-70.

Sowa B, Steibert E. 1985. Effect of oral cadmium administration to female rats during pregnancy on zinc, copper, and iron content in placenta, foetal liver, kidney, intestine and brain. *Arch. Toxicol.* **56**: 256-262.

Sridaran R, Gibori G. 1987. Placental–ovarian relationship in the control of testosterone secretion in the rat. *Placenta* **8**: 327-333.

Stasenko S, Bradford EM, Piasek M, Henson MC, Varnai VM, Jurasović J, Kušec V. 2010. Metals in human placenta: focus on the effects of cadmium on steroid hormones and leptin. *J. Appl. Toxicol.* **30**: 242-253.

Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB. 2000. Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Mol. Endocrinol.* **14**: 545-553.

Stolakis V, Tsakiris S, Kalafatakis K, Zarros A, Skandali N, Gkanti V, Kyriakaki A, Liapi C. 2013. Developmental neurotoxicity of cadmium on enzyme activities of crucial offspring rat brain regions. *Biomaterials* **26**: 1013.

Stonard MD, Webb M. 1976. Influence of dietary cadmium on the distribution of the essential metals copper, zinc and iron in tissues of the rat. *Chem. Biol. Interact.* **15**: 349-363.

Sugawara N, Sugawara C. 1991. Gastrointestinal absorption of Cd-metallothionein and cadmium chloride in mice. *Arch. Toxicol.* **65**: 689-692.

Suzuki KT, Tamagawa H, Takahashi K, Shimojo N. 1990. Pregnancy-induced mobilization of copper and zinc bound to renal metallothionein in cadmium-loaded rats. *Toxicology* **60**: 199-210.

Šerman A, Šerman LJ. 2011. Development of placenta in a rodent-model for human placentation. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* **3**: 233-239.

Takenaka S, Oldiges H, König H, Hochrainer D, Oberdörster G. 1983. Carcinogenicity of cadmium chloride in W rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **70**: 367-373.

- Takiguchi M, Yoshihara S. 2006. New aspects of cadmium as endocrine disruptor. *Environ. Sci.* **13**: 107-116.
- Taylor BA, Heiniger HJ, Meier H. 1973. Genetic analysis of resistance to Cd-induced testicular damage in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **143**: 629-633.
- Thévenod F. 2010. Catch me if you can! Novel aspects of cadmium transport in mammalian cells. *Biometals* **23**: 857-875.
- Thompson J, Bannigan J. 2008. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod. Toxicol.* **25**: 304-315.
- Tojyo H. 1983. Effect of different intensities of iron-deficient anemia in pregnant rats on maternal tissue iron and fetal development. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **29**: 339-351.
- Torreblanca A, Del Ramo J, Sarkar B. 1992. Cadmium effects on zinc metabolism in human trophoblast cells: involment of cadmium-induced metallothionein. *Toxicology* **72**: 167-184.
- Tsuchiya K (ur). 1978. *Cadmium studies in Japan: A review*. Kodansha Ltd.: Tokyo / Elsevier/North Holland Biomedocal Press: Amsterdam – New York.
- Tsuchiya K, Iwao S, Sugita M, Sakurai H. 1979. Increased urinary  $\beta_2$ -microglobulin in cadmium exposure: dose-effects relationship and the biological significance of  $\beta_2$ -microglobulin. *Environ. Health Perspect.* **28**: 147-153.
- United Nations Environmental Programme (UNEP). 2010. *Final Review of Scientific Information on Cadmium*. UNEP/GC.26/INF/11/Add. 2.  
<http://www.unep.org/chemicalsandwaste/LeadCadmium/ScientificReviews/CadmiumCd/tabid/29844/Default.aspx> pdf
- Van der Velde WJ, Copius Peereboom-Stegeman JHJ, Tretters PE, James J. 1983. Structural changes in the placenta of smoking mothers: a quantitative study. *Placenta* **4**: 231-240.
- van Wijngaarden E, Singer EA, Palapattu GS. 2008. Prostate-specific antigen levels in relation to cadmium exposure and zinc intake: results from the 2001-2002 National Health and Nutrition Examination Survey. *Prostate* **68**: 122-128.
- Varnai VM, Blanuša M, Piasek M, Kostial M. 2009. New therapeutic and experimental aspects of chelators and antidotes of metal toxicity. *Front. Med. Chem.* **4**: 130-182.
- Verboost PM, Senden MH, van Os CH. 1987. Nanomolar concentrations of  $\text{Cd}^{2+}$  inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  transport systems in plasma membranes and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in intestinal epithelium. *Biochim. Biophys. Acta* **902**: 247-253.
- Verougstraete V, Lison D, Hotz P. 2003. Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit Rev* **6**: 227-255.

Vinceti M, Venturelli M, Sighinolfi C, Trerotoli P, Bonvicini F, Ferrari A, Bianchi G, Serio G, Bergomi M, Vivoli G. 2007. Case-control study of toenail cadmium and prostate cancer risk in Italy. *Sci. Total Environ.* **373**: 77-81.

Waalkes MP, Rehm S, Riggs CW, Bare RM, Devor DE, Poirier LA, Wenk ML, Henneman JR, Balaschak MS. 1988. Cadmium carcinogenesis in male Wistar [CrI:(WI)BR] rats: dose-response analysis of tumor induction in the prostate and testes and at the injection site. *Cancer Res.* **48**: 4656-4663.

Waalkes MP, Pérez-Ollé R. 2000. Role of metallothionein in the metabolism, transport and toxicity of metals. U: *Molecular biology and toxicology of metals*, Zalups RK, Koropatnick J (ur). Taylor & Francis: London – New York; 414-459.

Waalkes MP. 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* **533**: 107-120.

Wang K, Zhou B, Kuo YM, Zemansky J, Gitschier J. 2002. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am. J. Hum. Genet.* **71**: 66-73.

Wang H, Zhu G, Shi Y, Weng S, Jin T, Kong Q, Nordberg GF. 2003. Influence of environmental cadmium exposure on forearm bone density. *J. Bone Mineral Res.* **18**: 553-560.

Wang B, Schneider SN, Dragin N, Girijashanker K, Dalton TP, He L, Miller ML, Stringer KF, Soleimani M, Richardson DD, Nebert DW. 2007. Enhanced cadmium-induced testicular necrosis and renal proximal tubule damage caused by gene-dose increase in a Slc39a8-transgenic mouse line. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **292**: C1523-C1535.

Wang B, He L, Dong H, Dalton TP, Nebert DW. 2011. Generation of a Slc39a8 hypomorph mouse: Markedly decreased ZIP8  $\text{Zn}^{2+}/(\text{HCO}_3^-)_2$  transporter expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**: 289-294.

Wang CY, Jenkitkasemwong S, Duarte S, Sparkman BK, Shawki A, Mackenzie B, Knutson MD. 2012. ZIP8 is an iron and zinc transporter whose cell-surface expression is up-regulated by cellular iron loading. *J. Biol. Chem.* **287**: 34032-34043.

Wastney ME, Aamodt RL, Rumble WF, Henkin RI. 1986. Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans. *Am. J. Physiol.* **251**: 398-408.

Webster WS. 1978. Cadmium-induced fetal growth retardation in the mouse. *Arch. Environ. Health* **33**: 36-42.

Wellinghousen N. 2001. Immunobiology of gestational zinc deficiency. *Br. J. Nutr.* **85**: S81-S86.

Whelton BD, Bhattacharyya MH, Carnes BA, Moretti ES, Peterson DP. 1988. Female reproduction and pup survival and growth for mice fed a cadmium-containing purified diet through six consecutive rounds of gestation and lactation. *J. Toxicol. Environ. Health* **24**: 321-343.

Wild CP. 2012. The exposome: from concept to utility. *Int. J. Epidemiol.* **41**: 24-32.

- Williams DM, Loukopoulos D, Lee GR, Cartwright GE. 1976. Role of copper in mitochondrial iron metabolism. *Blood* **48**:77-85.
- Wilson EA, Jawad MJ, Powell DE. 1984. Effect of estradiol and progesterone on human chorionic gonadotropin secretion *in vitro*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **149**: 143-148.
- Wood RJ, Zheng JJ. 1997. High dietary calcium intakes reduce zinc absorption and balance in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**: 1803-1809.
- World Health Organisation, Environmental Health Criteria series (WHO/EHC). 1992. *Cadmium*. Publication 134. Geneva, Švicarska: WHO Regional Office for Europe.
- World Health Organisation (WHO). 1998. *Copper*. Environmental Health Criteria 200. Geneva, Švicarska: WHO Regional Office for Europe.  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm>
- World Health Organisation (WHO). 2001. *Iron deficiency anaemia. Assessment, prevention and control*. A guide for programme managers. Geneva, Švicarska: WHO Regional Office for Europe. [http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida\\_assessment\\_prevention\\_control.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_prevention_control.pdf)
- World Health Organisation (WHO). 2010. *Exposure to cadmium: a major public health concern*. Geneva: Švicarska WHO Regional Office for Europe.  
<http://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf>
- Zalups RK, Ahmad S. 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **186**: 163-188.
- Zeng X, Jin T, Ahou Y, Nordberg GF. 2003. Changes of serum sex hormone levels and MT mRNA expression in rats orally exposed to Cd. *Toxicology* **186**: 109-118.
- Zeng X, Jin T, Jiang X, Kong Q, Ye T, Nordberg GF. 2004. Effects on the prostate of environmental cadmium exposure – a cross-sectional population study in China. *Biometals* **17**: 559-565.
- Zhang W, Pang F, Huang Y, Yan P, Lin W. 2008. Cadmium exerts toxic effects on ovarian steroid hormone release in rats. *Toxicol. Lett.* **182**: 18-23.
- Ziegler EE, Serfass RE, Nelson SE, Figueroa-Colón R, Edwards BB, Houk RS, Thompson JJ. 1989. Effect of low zinc intake on absorption and excretion of zinc by infants studied with <sup>70</sup>Zn as extrinsic tag. *J. Nutr.* **119**: 1647-1653.
- Zimmermann M B, Hurrell R F. 2007. Nutritional iron deficiency. *Lancet* **370**: 511-520.

## 9. SAŽETAK

Kadmij je sveprisutan onečišćivač ljudskog okoliša. Hrana je glavni izvor izloženosti kadmiju u općem stanovništvu, izuzev u osoba koje su pušači duhana. Želučanocrijevna apsorpcija kadmija ovisi o njegovom kemijskom obliku i sastavu prehrane kao i o biološkoj vrsti, spolu, dobi i osobnom fiziološkom/patofiziološkom stanju. Takva apsorpcija je uglavnom niska i njezin procijenjeni iznos je 1 do 10% u odraslih ljudi i 0,3 do 3% u pokusnih štakora. U istraživanjima na pokusnim miševima je pokazano da se želučanocrijevna apsorpcija kadmija tijekom graviditeta i laktacije poveća 2 do 3 puta. Kadmij ima dugo vrijeme biološkoga poluživota (10 do 30 godina) i tijekom cijeloga života se nakuplja u svim unutrašnjim organima, najviše u jetri i bubregu, a tijekom trudnoće i u posteljici.

Cilj ovog istraživanja je bio procijeniti učinke izloženosti kadmiju *per os* tijekom skotnosti štakorica na raspodjelu kadmija i stanje esencijalnih elemenata u unutrašnjim organima majke i fetusu kao i na funkcije posteljice u prijenosu mikronutrijenata i sintezi steroidnih hormona. Takvi su podaci u literaturi općenito nedostatni, a u uvjetima peroralne izloženosti kadmiju podaci o istraživanoj kombinaciji pokazatelja praktički ne postoje.

Hipoteze ovog istraživanja su bile da je kadmij toksičan metal za koji ne postoje dokazi o esencijalnosti za odvijanje fizioloških funkcija i biokemijskih procesa u sisavaca uključujući ljude i koji svojim nakupljanjem u posteljici može poremetiti prijenos mikronutrijenata do fetusa i sintezu hormona, uključujući posteljičnu steroidogenezu. To sve može ugrožavati održanje fetusa *in utero* i imati štetne učinke na zdravlje potomka nakon rođenja. Nepovoljne posljedice mogu biti u rasponu od smrti fetusa u maternici do smanjene količine mikronutrijenata u tkivima fetusa i novorođenčeta s razvojem postnatalne anemije i/ili deficijencije drugih esencijalnih elemenata važnih za perinatalni rast i razvoj. Mogući su i učinci kadmija kao endokrinog disruptora ženske reproduktivske funkcije i spolnog razvoja potomka što je u novije vrijeme predmet opsežnih istraživanja.

Proveli smo istraživanje na pokusnim štakoricama soja Wistar s pravilnim četverodnevnim estrusnim ciklusima koje su se parile s neizloženim mužjacima. Skotne štakorice su potom raspoređene u dvije skupine: štakorice izložene kadmiju u dozi od 50 mg Cd/l (u obliku  $\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ ) u demineraliziranoj vodi i neizložene kontrolne štakorice koje su napajane demineraliziranom vodom *ad libitum* 19 ili 20 dana tijekom graviditeta. Neskotne štakorice su istodobno raspoređene u skupinu izloženih kadmiju pod jednakim uvjetima tijekom 20 dana i neizloženu kontrolu. Posljednjeg su dana pokusa u općoj anesteziji sve životinje uzorkovane i usmrćene. Uzeti su uzorci pune krvi iz srca. Nakon iskrvarenja iz



trbušne aorte je izvađena gravidna maternica s jajnicima na kojima su prebrojana žuta tijela. Iz maternice su izvađeni, izvagani i uzorkovani posteljice i fetusi. Potom su izvađeni, izvagani i uzorkovani majčina jetra i desni bubreg. Uzorci pune krvi, jetre, bubrega, posteljice i fetusa su pripremljeni za analize elemenata metodom atomske apsorpcijske spektrometrije (F-AAS ili ET-AAS). Steroidni hormoni progesteron i testosteron su analizirani imunokemijski metodom IEMA izravno u serumu te u uzorcima pripremljenim iz posteljičnog tkiva, u kojima su oba hormona dodatno analizirana i metodom ELISA.

U izloženih skotnih i neskotnih štakorica u odnosu na odgovarajuće kontrole su nađena povećanja kadmija u svim analiziranim tkivima i cinka u jetri. Kadmij se nakupljao u posteljici i mala količina kadmija je izmjerena i u fetusu. Količine željeza u fetusu i cinka u fetusu i/ili u posteljici su bile smanjene. U izloženih skotnih *vs.* izložene neskotne štakorice nađene su statistički značajno izraženija povećanja koncentracije kadmija u krvi, količina kadmija u jetri i bubregu i izraženija smanjenja količina željeza u jetri i bubregu te cinka i bakra u bubregu. Bez obzira na izloženost kadmiju, u svih skotnih *vs.* neskotne štakorice nađena je veća koncentracija kadmija u krvi i količina bakra u bubregu i manje količine željeza u jetri i bubregu te bakra u jetri. Koncentracije progesterona i testosterona u serumu i njihove količine u posteljici se nisu razlikovale između štakorica izloženih kadmiju i neizloženih kontrola. Nađene su značajne podudarnosti vrijednosti za svaki od steroidnih hormona u posteljici izmjerenih metodama IEMA i ELISA.

U zaključku, ovim radom su dobiveni izvorni podaci o posteljičnim količinama progesterona i testosterona (kao prekursora u sintezi estradiola u jajniku) kao i o njihovim koncentracijama u serumu blizu roka okoćenja štakorice. Novi i izvorni rezultati su da peroralna izloženost štakorica dozi od 6,5 mg Cd/kg tjelesne mase otopinom za napajanje tijekom skotnosti uzrokuje povećano nakupljanje kadmija u majčinom organizmu na što upućuju nalazi povećanih koncentracija kadmija u krvi i količina kadmija u jetri i bubregu u usporedbi s vrijednostima dobivenim u neskotnih štakorica pod jednakim uvjetima izloženosti kadmiju. Promjene u stanju mikronutrijenata željeza, cinka i bakra izazvane izloženošću kadmiju su jače izražene u skotnih nego u neskotnih štakorica. Te biokemijske promjene u organizmu izložene skotne štakorice, uz istodobno nakupljanje kadmija u posteljici, remete prijenos željeza i cinka kroz posteljicu što sve zajedno može ugroziti opskrbu nutrijentima i preživljavanje fetusa *in utero*.

## 10. SUMMARY

Cadmium is a pervasive contaminant of the human environment. Food is the main source of cadmium exposure in the general population, except in tobacco smokers. Gastrointestinal absorption of cadmium depends on its chemical form and dietary factors as well as biological species, gender, age and individual physiological/pathophysiological state. This absorption is generally low and is estimated at 1 to 10% in adult humans and 0.3 to 3% in laboratory rats. It has been noted that gastrointestinal cadmium absorption during gestation and lactation in experimental mice increases 2 to 3 times. Cadmium has a long biological half-life (10 to 30 years) and accumulates during the lifetime in all internal organs, mainly in the liver and kidney, and during pregnancy also in the placenta.

This investigation aimed to assess the effects of cadmium exposure *per os* during rat pregnancy on cadmium distribution and essential element status in the maternal internal organs and foetus as well as on placental functions in micronutrient transfer and steroid hormone synthesis. Such data are generally lacking in the literature and are virtually absent for the studied combination of endpoints under conditions of oral cadmium exposure.

The research hypotheses were that cadmium is a toxic metal without any evidence on essentiality in physiological functions and biochemical processes of mammals in general and humans, which can, by its accumulation in the placenta, disrupt placental micronutrient transfer to the foetus and hormone synthesis including placental steroidogenesis. All these can put uterine foetal viability at risk and have potential adverse effects on the postnatal health of offspring. Unfavourable consequences may range from foetal death *in utero* to reduced micronutrient concentrations in foetal and neonatal tissues with the potential of developing consecutive anaemia and/or other essential element deficiencies after birth, each having a key role in perinatal growth and development. Cadmium also has the potential to act as an endocrine disruptor of female reproduction and reproductive development of offspring, which is a matter of current extensive research activities.

We conducted a study on the experimental female rat strain Wistar with regular 4-day oestrus cycles mated with unexposed males. Pregnant rats were assigned into two groups: rats exposed to cadmium at 50 mg Cd/l (as  $\text{CdCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) in demineralised water and unexposed control rats supplied with demineralised water *ad libitum* during 19 or 20 days of pregnancy. Non-pregnant rats were also assigned to the cadmium-exposed group and unexposed controls and concurrently treated under the same exposure conditions during 20 days. On the last day of the experiment all of the rats were sampled and killed under general anaesthesia. Samples

of whole blood were taken from the heart. After exsanguination from the abdominal aorta, gravid uterus was removed together with ovaries in which corpora lutea were enumerated. From the uterus, placentas and foetuses were dissected, weighed, and sampled. Subsequently maternal liver and right kidney were dissected, weighed, and sampled. Samples of blood, liver, kidney, placenta, and foetus were prepared for element analyses by atomic absorption spectrometry (F-AAS or ET-AAS). Steroid hormones progesterone and testosterone were analysed by immunoenzymometric assay (IEMA) directly in maternal serum and in samples prepared from placental tissue, in which both hormones were additionally checked by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

In all of the exposed pregnant and non-pregnant rats compared to the controls, increases of cadmium in the analysed samples and of zinc in the liver were found. Cadmium accumulated in the placenta and low cadmium content was also measured in the foetus. The contents of foetal iron and zinc and/or placental zinc were decreased. In the exposed pregnant *vs.* exposed non-pregnant rats, statistically significantly more pronounced increases of cadmium concentrations in the blood and cadmium contents in the liver and kidney and more pronounced decreases of iron contents in the liver and kidney were found, as well as zinc and copper contents in the kidney. Irrespective of cadmium exposure, in pregnant *vs.* non-pregnant rats higher blood cadmium concentrations and kidney copper content, lower liver and kidney iron and liver copper contents were found. Progesterone and testosterone concentrations in serum and their contents in placenta did not differ between cadmium-exposed and unexposed control mother rats. Significant correlations were found for values of either steroid hormone in placenta measured by IEMA and ELISA.

In conclusion, this work provides original evidence on rat placental contents of progesterone and testosterone (as the precursor for oestradiol synthesis in the ovary) and their concentrations in serum at term. It also brings about new and original results that oral exposure to 6.5 mg Cd/kg body mass in drink during rat pregnancy causes increased cadmium retention as shown by higher cadmium blood concentrations and higher cadmium contents in the liver and kidney as compared to the values in the non-pregnant rats exposed to cadmium under the same conditions. The changes in the cadmium-induced status of micronutrients, iron, zinc and copper are more pronounced in the pregnant than in the non-pregnant rats. These biochemical changes in the organism of exposed expectant mother rat, together with the accumulation of cadmium in the placenta, disrupt the transplacental transfer of iron and zinc, which may altogether compromise the maintenance of foetal nutrition and viability *in utero*.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

### UČINAK KADMIJA NA FUNKCIJE POSTELJICE U PRIJENOSU ESENCIJALNIH MIKROELEMENATA I SINTEZI STEROIDNIH HORMONA U ŠTAKORICA

*Anja Mikolić*

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska

Hrana je glavni izvor izloženosti ljudi esencijalnim i toksičnim metalima, uključujući kadmij (Cd). Cilj istraživanja je bio procijeniti učinke peroralne izloženosti Cd tijekom skotnosti štakorice na razdiobu kadmija i stanje mikronutrijenata u majčinom organizmu i fetusu te funkcije posteljice u prijenosu nutrijenata i sintezi steroidnih hormona. Hipoteze istraživanja su bile da se tijekom graviditeta povećava želučanocrijevna apsorpcija Cd koji se nakuplja u posteljici i može poremetiti prijenos nutrijenata do fetusa i sintezu posteljičnih hormona. Pokusne štakorice (Wistar) su nakon parenja izlagane dozi od 50 mg Cd/l (u obliku  $\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ ) u vodi za piće od 1. do 19. ili 20. dana skotnosti. Neskotne štakorice su istodobno izlagane pod jednakim uvjetima izloženosti tijekom 20 dana. Posljednjeg dana pokusa je svim štakoricama u općoj anesteziji izvađena krv iz srca i uzorkovani unutrašnji organi, posteljice i fetusi, koji su pripremljeni za analize mikroelemenata (metodom AAS). Progesteron i testosteron su analizirani imunokemijski izravno u serumu (metodom IEMA) i u uzorcima pripremljenim iz posteljičnog tkiva (metodama IEMA i/ili ELISA). U svih izloženih štakorica su nađena povećanja Cd u svim izmjeranim uzorcima i cinka u jetri. Količine željeza u fetusu i cinka u fetusu i/ili posteljici su bile smanjene. U izloženih skotnih *vs.* izložene neskotne štakorice su bila izraženija povećanja koncentracije Cd u krvi i količina Cd u jetri i bubregu kao i smanjenja količina željeza u jetri i bubregu te cinka i bakra u bubregu. U svih skotnih *vs.* neskotne štakorice su bile veće koncentracije Cd u krvi i količine bakra u bubregu te manje količine željeza u jetri i bubregu i bakra u jetri. Nije bilo promjena u steroidnim hormonima ni u serumu, ni u posteljici, u kojoj su vrijednosti svakog hormona izmjerene dvjema imunokemijskim metodama značajno korelirale. U zaključku, ovim radom su dobiveni izvorni podaci o vrijednostima progesterona i testosterona (kao prekusora za sintezu estradiola u jajniku) u serumu i posteljici štakorice blizu roka okoćenja. Novi i izvorni znanstveni rezultati su da peroralna izloženost štakorica dozi od 6,5 mg Cd/kg tjelesne mase otopinom za napajanje tijekom skotnosti povećava razine Cd u krvi, jetri i bubregu s posljedičnim biokemijskim promjenama mikronutrijenata u većoj mjeri nego u neskotnih štakorica što istodobno s nakupljanjem Cd u posteljici remeti transplacentarni prijenos željeza i cinka te može predstavljati opasnost za rast i razvoj fetusa *in utero*.

(152 stranica, 5 slika, 17 tablica, 3 priloga, 324 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Ante Kovačića 1, Zagreb

Ključne riječi: kadmij, posteljica, fetus, željezo, cink, bakar, progesteron, testosteron, graviditet, štakorica

Mentor: dr. sc. Martina Piasek, znan. savj. u tr. zv.

Ocjenjivači: dr.sc. Valerije Vrček, red. prof.  
dr.sc. Irena Žuntar, izv. prof.  
dr.sc. Ljiljana Šerman, izv. prof.

Rad je prihvaćen: 25. veljače 2015.

## BASIC DOCUMENTARY CARD

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Dissertation

### **THE EFFECT OF CADMIUM ON PLACENTAL FUNCTIONS IN TRANSPORT OF ESSENTIAL MICROELEMENTS AND STEROID HORMONE SYNTHESIS IN RATS**

*Anja Mikolić*

Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia

Food is the main source of human exposure to essential and toxic metals, including cadmium (Cd). This investigation aimed to assess the effects of oral Cd exposure during rat pregnancy on Cd distribution and micronutrient status in a maternal organism and foetus and placental functions in nutrient transport and steroid hormone synthesis. Research hypotheses were that Cd gastrointestinal absorption increases during pregnancy and Cd accumulates in the placenta where it may interfere with nutrient transport to the foetus and placental hormone biosynthesis. Female rats (Wistar) were mated and exposed to 50 mg Cd/l (as CdCl<sub>2</sub>·xH<sub>2</sub>O) in drinking water from gestation day 1 through 19 or 20. Non-pregnant rats were concurrently exposed during 20 days under the same exposure conditions. On the last experimental day, under general anaesthesia, blood was taken by cardiac puncture from all of the rats and internal organs, placentas and foetuses were dissected and prepared for element analysis (by AAS). Progesterone and testosterone were assayed by immunochemical methods directly in sera (by IEMA) and in placental tissue-derived samples (by IEMA and/or ELISA). All of the exposed rats exhibited increases in Cd in all of the analysed samples and zinc in the liver. Contents of iron in the foetus and zinc in the foetus and/or placenta were decreased. In exposed pregnant *vs.* exposed non-pregnant rats, more pronounced increases in Cd concentration in the blood and Cd contents in the liver and kidney, decreases in iron contents in the liver and kidney, and decreases in zinc and copper contents in the kidney were recorded. In all pregnant *vs.* non-pregnant rats, higher Cd concentrations in the blood and copper content in the kidney and lower iron contents in the liver and kidney and copper content in the liver were found. Steroid hormones did not change in either the serum or placenta; in the latter the values of either hormone measured by two immunochemical assays were correlated. In conclusion, this work provides original evidence on progesterone and testosterone (as the precursor for the ovarian oestradiol synthesis) in rat serum and placenta at term. New and original research results are that oral Cd exposure to 6.5 mg Cd/kg body mass in drink during rat pregnancy increases levels of Cd in the blood, liver and kidney with consequent biochemical changes of micronutrients more pronouncedly than in non-pregnant rats, which together with accumulation of Cd in the placenta disrupts the transplacental handover of iron and zinc and may put at risk foetal growth and development *in utero*.

(152 pages, 5 figures, 17 tables, 324 references, 3 supplements, original in Croatian)

Thesis is deposited in the library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Ante Kovačića 1, Zagreb

Key words: cadmium, placenta, foetus, iron, zinc, copper, progesterone, testosterone, pregnancy, female rat

Supervisor: Martina Piasek, Ph. D., Scientific Advisor–Senior Researcher

Reviewers: Valerije Vrček, Ph. D., Full Professor  
Irena Žuntar, Ph. D., Associate Professor  
Ljiljana Šerman, Ph. D., Associate Professor

Thesis accepted: 25<sup>th</sup> February 2015

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 7. svibnja 1979. godine u Splitu. Osnovnu školu i opću gimnaziju završila sam u Splitu, gdje sam stekla i osnovno glazbeno obrazovanje. Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu upisala sam 1997. godine studij Biotehnologija, smjer biokemijsko-mikrobiološki. Diplomski rad pod naslovom „Sinteza Amadorijevih spojeva bioaktivnog tetrapeptida“ izradila sam u Laboratoriju za kemiju ugljikohidrata, peptida i glikopeptida, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u istraživačkom timu Štefice Horvat uz mentorsko vođenje Jasne Vorkapić-Furač i diplomirala 2005. godine.

Pripravnički staž u trajanju od 6 mjeseci obavila sam u Službi za zdravstvenu ekologiju Zavoda za javno zdravstvo grada Zagreba 2006. godine.

Od kolovoza 2007. godine sam zaposlena u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam, gdje sam počela raditi kao asistent-znanstveni novak na projektu MZOŠ/MZOS „Izloženost metalima i njihovi učinci u graviditetu i postnatalnom razdoblju“ pod voditeljstvom Martine Piasek, koja je ujedno i mentor mojeg doktorskog rada. Iste godine sam upisala poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti, modul Medicinsko-biokemijske znanosti, na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Prvi sam autor u jednom i ravnopravan koautor u tri izvorna znanstvena članka objavljena u časopisima indeksiranim u *Current Contents*. Koautor sam pozvanog preglednog rada u zborniku radova s međunarodnog simpozija. Prvi sam autor ili ravnopravan koautor sažetaka priopćenja na šest međunarodnih i dva domaća znanstvena skupa, od čega su četiri sažetka imala međunarodnu recenziju i objavljena u časopisima indeksiranim u *Current Contents*. Sudjelovala sam na tri međunarodna tečaja i jednom sastanku stručnog društva.

Članica sam Hrvatskoga toksikološkog društva, Hrvatskog društva fiziologa i Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama.

## ***Popis objavljenih radova i kongresnih priopćenja***

### **1. Znanstveni radovi u časopisima indeksiranim u *Current Contents* (CC)**

1. Mikolić A, Piasek M, Sulimanec Grgec A, Varnai VM, Stasenکو S, Kralik Oguić S. 2014. Oral cadmium exposure during rat pregnancy: assessment of transplacental micronutrient transport and steroidogenesis at term. *J. Appl. Toxicol.* doi:10.1002/jat.3055 (Early View; published online 25 Sep 2014).
2. Piasek M, Mikolić A, Sekovanić A, Sulimanec Grgec A, Jurasović J. 2014. Cadmium in placenta - a valuable biomarker of exposure during pregnancy in biomedical research. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **77**: 1071-1074.
3. Brajenović N, Brčić Karačonji I, Mikolić A, Stasenکو S, Piasek M. 2013. Tobacco smoke and pregnancy: segmental analysis of nicotine in maternal hair. *Arch. Environ. Occup. Health* **68**: 117-122.
4. Jakas A, Katić A, Bionda N, Horvat Š. 2008. Glycation of a lysine-containing tetrapeptide by D-glucose and D-fructose - influence of different reaction conditions on the formation of Amadori/Heyns products. *Carbohydr. Res.* **343**: 2475-2480.

### **2. Pregledni rad na poziv u Zborniku radova s međunarodnog simpozija**

Piasek M, Mikolić A. 2009. Minerals and physiology (From essentiality to toxicity: A review of important minerals and their major impact on the human body's physiology). U: *Role of Minerals in Food Technology and Nutrition*, Gašperlin L, Žlender B (ur). 26<sup>th</sup> Food Technology Days dedicated to Prof. F. Bitenc. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živalstvo and Slovensko prehransko društvo; 9-19.

### **3. Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u časopisima s međunarodnom recenzijom indeksiranim u CC ili *SCI-Core Collection***

1. Sekovanić A, Jurasović J, Orct T, Brajenović N, Brčić Karačonji I, Mikolić A, Sulimanec Grgec A, Stasenکو A, Piasek M. 2013. Placental cadmium concentration as an indicator of maternal tobacco smoking. Trace Element Research on Health and Diseases – ISTERH 2013, Tokio, Japan, 2013. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **27** (Suppl): 47.
2. Piasek M, Jurasović J, Mikolić A, Stasenکو S, Kušec V, Henson MC. 2012. Cadmium as a placental endocrine disruptor in humans. 48<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology – EUROTOX 2012, Stockholm, Švedska, 2012. Abstracts. *Toxicol. Lett.* **211** (Suppl.): S37-S38.
3. Mikolić A, Piasek M. 2010. Oral cadmium exposure and placental steroidogenesis in rats. XII International Congress of Toxicology – IUTOX 2010, Barcelona, Španjolska, 2010. Abstracts. *Toxicol. Lett.* **196** (Suppl.): S302.

4. Katić (Mikolić) A, Piasek M, Lazarus M, Kljaković-Gašpić Z, Jurasović J. 2008. Effects of oral cadmium exposure during pregnancy on maternal and foetal element distribution and steroidogenesis in rats. 45<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology – EUROTOX, Rodos, Grčka, 2008. Abstracts. *Toxicol. Lett.* **180** (Suppl.): S55.
5. Mikolić A, Kralik Oguić S, Kušec V, Piasek M. 2012. Exposure to cadmium and effects on placental steroidogenesis in rats: comparing oral *versus* parenteral route of exposure. 4. hrvatski toksikološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem – CROTOX 2012, Primošten, Hrvatska, 2012. Abstracts of the 4<sup>th</sup> Croatian Congress of Toxicology (CROTOX 2012). *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **63** (Suppl. 2): 36.

#### **4. Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u knjigama sažetaka**

1. Mikolić A, Sulimanec A, Vihnanek Lazarus M, Piasek M. 2012. The comparison of the effects of cadmium exposure on trace element distribution in rats: oral versus parenteral exposure during pregnancy. International Cadmium Symposium - ICS 2012, Sassari (Sardinija), Italija, 2012. Abstract Book str. 62.
2. Sulimanec A, Mikolić A, Jurasović J, Piasek M. 2012. Interaction of cadmium with essential trace elements after oral cadmium exposure: comparing non-pregnant and pregnant rats. International Cadmium Symposium - ICS 2012, Sassari (Sardinija), Italija, 2012. Abstract Book str. 61.
3. Sulimanec A, Mikolić A, Piasek M. 2010. Oral exposure to cadmium and its interaction with iron and zinc in non-pregnant and pregnant rats. 7<sup>th</sup> International Congress on Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Opatija, Hrvatska, 2010. Book of Abstracts str. 50.
4. Jakas A, Katić A, Bionda N, Horvat Š. 2007. Susceptibility of the tetrapeptide LSKL to glycation. 9<sup>th</sup> International Symposium on the Maillard Reaction – ISMR 9; München, Njemačka 2007. Scientific Program and Abstracts str. 167.
5. Mikolić A, Sulimanec Grgec A, Piasek M. 2014. Oral cadmium exposure during pregnancy: assessment of microelement distribution in mother rats and foetus at term. Drugi simpozij Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama s međunarodnim sudjelovanjem „Pokusne životinje u znanstvenim istraživanjima“, Zagreb, Hrvatska, 2014. Knjiga sažetaka/Book of Abstracts str.72-73.



**Prilog 1. Preslika certifikata standardnog krmiva za laboratorijske štakore i miševe rabljenog u istraživanjima s rezultatima analiza provedenim 2009. godine**



**M mucedola srl**

via g. galliei, 4 - 20019 settimo milanese (mi) - italy  
tel. 02 48 91 55 81 r.a. - fax 02 48 91 56 95 - www.mucedola.it

SISTEMA DI GESTIONE  
QUALITÀ  
UNI EN ISO 9001:2000  
CERTIFICATO DA  
CERTIQUALITY  
N. 2555/1

Certificate of Analysis n° 74 of 2 February 2009

Revision of 27 February 2009

**Standard Diet G.L.P. 4RF21 certificate**

**Complete feed for MICE and RATS  
Maintenance for Short and Middle Period**

Batch: 2154

Shape: pellet 12 mm

SHELF LIFE / Best Before September-09

BROMATOLOGICAL ANALYSIS	%	Method of analysis	Batch 2154	Batch 215401	Batch 215402	Batch 215403	Batch 215404
Moisture		MUCUM	10.13	8.59	9.38	9.50	9.95
Crude protein	s.l.q	MUCPR	18.64	18.70	19.14	19.23	19.02
Crude fat	s.l.q	MUCGR	4.06	2.98	-	-	3.03
Crude fibre (Wende)	s.l.q	MUCCF	5.98	-	5.89	-	-
Ash	s.l.q	MUCCN	6.30	-	-	6.22	-

COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE

PESTICIDES ANALYSIS	Value [µg/kg]	Method of analysis	D.L.
<b>Organochlorine</b>			
Esaclobenzene	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
α-BHC	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
β-BHC	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
γ-BHC (Lindane)	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Keltane	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Eptacior	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Eptacioroepoxide	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
DDE	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
DDD	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
DDT	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Dieldrin	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Endrin	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Thiodan	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
<b>Organophosphorus</b>			
Phosdrin	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Diazinon	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Disulfoton	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Phymiphosmetyl	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Ronnel	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Dimetoate	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Fenthion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Metylparathion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Malathion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Fenitrothion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Parathion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Phosphamidon	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Methyathion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Phenamphos	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Ethion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Diclorvos	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Clorphyriphosmetyl	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
PCB	ND	EPA - 8082	20 µg/kg

ND = not detectable  
D.L. = detection limit

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS	Value cfu/g	Method of analysis
Total Viable Organism	11000	MUC.CBT
Total Coliforms	< 10	MUC.COL
Enterobacteriaceae	< 100	MUC.ENTBAT
Yeasts	< 50	MUC.ML
Molds	< 50	MUC.ML
<b>Fecal indicators</b>		
Enterococcus faecium	< 10	MUC.ENT
Enterococcus faecalis	< 10	MUC.ENT
E.coli	< 10	MUC.E.coli
<b>Pathogens</b>		
Staphylococcus aureus	< 10	MUC.STAPH
Clostridium perfringens	< 10	MUC.PERF
Salmonelle	absent in 25 g	MUC.SAL

	Value	Method of analysis	D.L.
OESTROGENIC ACTIVITY (DES eq)	not detected	Met.Uff di An.Aim.Zoot.3638/1/bis	20 µg/kg
INHIBITING SUBSTANCES	absent	MUC.INIB.	-
<b>MYCOTOXINES</b>			
Total Aflatoxines (B1,B2 - G1,G2)	ND µg/kg	MUC.AFLA2	5 µg/kg
<b>HEAVY METALS AND MINERALS</b>			
Lead (Pb)	0.075 mg/kg	EPA - 7420	0.05 mg/kg
Cadmium (Cd)	0.144 mg/kg	EPA - 7130	0.05 mg/kg
Selenium (Se)	ND mg/kg	EPA - 7740	0.05 mg/kg
Arsenic (As)	ND mg/kg	EPA - 7060 A	0.05 mg/kg
Mercury (Hg)	ND mg/kg	EPA - 7471	0.05 mg/kg
<b>OTHERS</b>			
Nitrite (NaNO <sub>2</sub> )	5.73 mg/kg	Colorimetric method	0.5 mg/kg
Nitrate (NaNO <sub>3</sub> )	39.60 mg/kg	Ionic chromatography	5 mg/kg
Fluoride (F)	1.68 mg/kg	Ionic chromatography	0.25 mg/kg
Nitrosamines	< 10 µg/kg	GC-MS	0.5 µg/kg

Comply with 82/100/EEC  
The Quality Control  
**Fabio BELLACOSA**

Approved by  
The Technical Manager  
**Dr Elisabetta MUCEDOLA**

The original certificates of analysis and the samples are kept in our archives

Reg. Imp. Milano 09353710156 - REA n. 1285086 - P.IVA 09353710156 - Cap. Soc. € 780.000,00 i.v.  
Aut. M.I.C.A. N° MG 830-RA 252 bis del 13/1/93 - Aut. Min. San. 582/A del 25-7-90  
Reg. Lomb. Degr. n. 10869 del 10/02/01 - Degr. n. 10870 del 11/02/02 - Degr. n. 10871 del 10/02/03 - Degr. n. 10872 del 10/02/04

## Prilog 2. Preslika certifikata standardnog krmiva za laboratorijske štakore i miševe rabljenog u istraživanjima s rezultatima analiza provedenim 2010. godine



via g. galilei, 4 - 20019 settimo milanese (mi) - Italy  
tel. 02 48 91 55 81 r.a. - fax 02 48 91 56 95 - www.mucedola.it

SISTEMA DI GESTIONE  
QUALITÀ  
UNI EN ISO 9001:2008  
CERTIFICATO DA  
CERTIQUALITY  
N. 2655

Certificate of Analysis n° 206 of 2 April 2010

Revision of 6 May 2010

### Standard Diet 4RF21 certificate

Complete feed for MICE and RATS  
Maintenance for Short and Middle Period

Shape: pellet 12 mm

SHELF-LIFE: Best Before 9 months from DOM (Date of Manufacture)

BROMATOLOGICAL ANALYSIS	Method of analysis	Control Batch 2352	Batch 235201 DOM 15/04/2010
		Value %	Value %
Moisture	MUC.UM	9.10	10.56
Crude protein	MUC.PR	18.84	18.60
Crude fat	MUC.GR	3.26	3.05
Crude fibre	MUC.CF	5.76	-
Ash	MUC.CN	6.67	-

PESTICIDES ANALYSIS	Value [µg/kg]	Method of analysis	D.L.
<b>Organochlorine</b>			
Esaclorobenzene	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
α-BHC	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
β-BHC			
γ-BHC (Lindane)	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Keltane	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Eptaclor	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Eptaclorepoxide	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
DDE	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
DDD			
DDT			
Dieldrin	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Endrin	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Thiodan	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
<b>Organophosphorus</b>			
Phosdrin	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Diazinon	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Disulfoton	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Phyrimphosmethyl	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Ronnel	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Dimetate	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Fenthion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Metylparathion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Malathion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Fenitrothion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Parathion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Phosphamidon	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Methydatathon	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Phenamiphos	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Elthion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Diclorvos	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Clorphyriphosmethyl	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
PCB	ND	EPA - 8082	20 µg/kg

ND = not detectable  
D.L. = detection limit

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS	Value CFU/g	Method of analysis
Total Viable Organism	17000	MUC.CBT
Total Coliforms	< 10	MUC.COL
Enterobacteriaceae	< 100	MUC.ENTBAT
Yeasts	< 50	MUC.ML
Molds	< 50	MUC.ML
<b>Fecal indicators</b>		
Enterococcus faecium	< 10	MUC.ENT
Enterococcus faecalis	< 10	MUC.ENT
E.coli	< 10	MUC.E.coli
<b>Pathogens</b>		
Staphylococcus aureus	< 10	MUC.STAPH
Clostridium perfringens	< 10	MUC.PERF
Salmonella	absent in 25 g	MUC.SAL

	Value	Method of analysis	D.L.
ESTROGENIC ACTIVITY (DES eq)	ND	Met.Uff.di An.Alim Zool.3838/1/bis	20 µg/kg
INHIBITING SUBSTANCES	absent	MUC.INIB.	
<b>MYCOTOXINES</b>			
Total Aflatoxines (B1,B2 - G1,G2)	ND µg/kg	MUC.AFLA2	5 µg/kg
<b>HEAVY METALS AND MINERALS</b>			
Lead (Pb)	0.880 mg/kg	EPA - 7420	0.05 mg/kg
Cadmium (Cd)	0.066 mg/kg	EPA - 7130	0.05 mg/kg
Selenium (Se)	ND mg/kg	EPA - 7740	0.05 mg/kg
Arsenic (As)	ND mg/kg	EPA - 7060 A	0.05 mg/kg
Mercury (Hg)	ND mg/kg	EPA - 7471	0.05 mg/kg
<b>OTHERS</b>			
Nitrite (NaNO <sub>2</sub> )	6.070 mg/kg	Colorimetric method	0.5 mg/kg
Nitrate (NaNO <sub>3</sub> )	62.080 mg/kg	Ionic chromatography	5 mg/kg
Fluoride (F)	3.270 mg/kg	Ionic chromatography	0.25 mg/kg
Nitrosodimethylamine	< 0.5 µg/kg	GC-MS	0.5 µg/kg
Nitrosodimethylamine	< 0.5 µg/kg	GC-MS	0.5 µg/kg

Comply with 1310

The Quality Control

Fabio BELLACOSA

Approved

The Technical Manager

Dr Elisabetta MUCEDOLA

The original certificates of analysis and the samples are kept in our archives

Reg. Imp. Milano 09353710156 - REA n. 1285086 - P.IVA 09353710156 - Cap. Soc. € 780.000,00 I.v.

Aut. M.I.C.A. N° MG 830-RA/252 bis del 13/1/93 - Aut. Min. San. 582/A del 25-7-90

M27\_R1 del 09/03/2010

Reg. Lomb. Decr. n. 10869 r/T100001MI - Decr. n. 10870 r/T100002MI - Decr. n. 10871 r/T100003MI - Decr. n. 10872 r/T100004MI

### Prilog 3. Pregled literaturnih podataka o učincima izloženosti kadmiju *per os* tijekom reproduktivnog razdoblja u malih pokusnih glodavaca

(nastavak 1/6)

[illegible]

### Prilog 3. Pregled literaturnih podataka o učincima izloženosti kadmiju *per os* tijekom reproduktivnog razdoblja u malih pokusnih glodavaca

(nastavak 2/6)

[illegible]

### Prilog 3. Pregled literaturnih podataka o učincima izloženosti kadmiju *per os* tijekom reproduktivnog razdoblja u malih pokusnih glodavaca

(nastavak 3/6)

[illegible]

Prilog 3. Pregled literaturnih podataka o učincima izloženosti kadmiju *per os* tijekom reproduktivnog razdoblja u malih pokusnih glodavaca

(nastavak 4/6)

Autor/i god.	Vrsta pokusne životinje	Uvjeti izloženosti <i>per os</i>	Doza/e Cd u pokusu	Broj životinja: početak/ skotnih/ po skupini	Učinci izloženosti kadmiju <i>per os</i>															
					Tjelesna masa/ prirast tjel. mase majke	Unos tekućine	Broj zametaka/ broj fetusa (mla- dunaca)/ veličina legla	Tjel. mase fetusa (mladu- naca)	Količina Fe				Količina Zn				Količina Cu			
									Majčin organizam			Plod	Majčin organizam			Plod	Majčin organizam			Plod
									jetra	bu- breg	poste- ljica	fetus/ mla- dunci	jetra	bu- breg	poste- ljica	fetus/ mla- dunci	jetra	bu- breg	poste- ljica	fetus/ mla- dunci
Učinci pri dozama od <50 mg Cd/l u piću <i>ad libitum</i>																				
Webster 1978.	mišice	u vodi za piće, tijekom skotnosti	10, 20, I 40 mg/l	-	-/-	-/-	-/-/-	↓ na dan okoćenja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Petering i sur. 1979.	štakorice	u vodi za piće, prije začeća i/ili tijekom skotnosti	4,3 8,6 17,2 34,4 µg/ml	-/-/-	-/-	-/-	-/-/↔	↓ na dan okoćenja; (doze 17,2 i 34,4 µg/ml)	-	-	-	↓ doze 8,6 do 34,4 µg/ml	-	-	-	↓ samo tijekom skotno- sti doza 17,2 µg/ml	-	-	-	↓ sve doze
Ali i sur. 1986.	štakorice	u vodi za piće, tijekom skotnosti	4,2 i 8,4 mg/l	-/-/-	-/-	-/-	-/-/-	↓ (na dan okoćenja; 8,4 mg/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ishitobi i Watanabe 2005.	mišice	u vodi za piće, od začeća do 10. dana nakon okoćenja	1 i 10 mg/l	40/18/6	↔/-	-/-	-/-/↔	↔	-	-	-	-	-	-	-	↑ jetra i bubreg 0. dan okoć. doza 10 mg/l	-	-	-	↓ jetra i bubreg 10. dan okoć. doza 10 mg/l

### Prilog 3. Pregled literaturnih podataka o učincima izloženosti kadmiju *per os* tijekom reproduktivnog razdoblja u malih pokusnih glodavaca

(nastavak 5/6)

[illegible]

Prilog 3. Pregled literaturnih podataka o učincima izloženosti kadmiju *per os* tijekom reproduktivnog razdoblja u malih pokusnih glodavaca

(nastavak 6/6)

Autor/i, god.	Vrsta pokusne životinje	Uvjeti izloženosti <i>per os</i>	Doza/e Cd u pokusu	Broj životinja: početak/skotnih/ po skupini	Učinci izloženosti kadmiju <i>per os</i>															
					Tjelesna masa/ prirast tjel. mase majke	Unos tekućine/ unos krmiva	Broj zametaka/ broj fetusa (mladunaca)/ veličina legla	Tjel. mase fetusa (mladunaca)	Količina Fe				Količina Zn				Količina Cu			
									Majčin organizam			Plod	Majčin organizam			Plod	Majčin organizam			Plod
									jetra	bubreg	posteljica	fetus/ mladunci	jetra	bubreg	posteljica	fetus/ mladunci	jetra	bubreg	posteljica	fetus/ mladunci
Blanuša i sur. 1993.	štakorice Wistar	u krmivu, 2 tj. prije parenja, tijekom skotnosti i dojenja	10 mg/kg	-/-/9-10	↔/-	-/-	-/-/-	↓	↓	↔	-	↓ jetra i bubreg 11. dan nakon okoć.	↔	↑	-	↔	↓	↔	-	↓ jetra i bubreg 11. dan nakon okoć.
Schönwald, 1995.	štakorice Wistar	u krmivu, 2 tj. prije parenja, tijekom skotnosti i dojenja	10 mg/kg	80/39/9-10	↔/-	↔/↔	-/↔/↔	↓ na dan okoć. i 11. dan nakon okoć.	↓	↔	-	↓ jetra i bubreg 11. dan nakon okoć.	↔	↑	-	↔	↓	↔	-	↓ jetra na dan okoć. i 11. dan nakon okoć. bubreg 11. dan nakon okoć.
Učinci pri dozama 1 i 10 mg Cd/kg tjel. mase dano želučanom sondom*																				
Kuriwaki i sur. 2005.	štakorice Wistar	sondom od 9. do 19. dana skotnosti	1 10 mg/kg t. m. na dan	16/16/5-6	-	-/-	-/↔/-	-	-	-	↔	↓ jetra doza 10 mg/kg na dan	-	-	↔	↓ jetra doza 10 mg/kg na dan	-	-	↓	↓ jetra doza 10 mg/kg na dan

**OBJAŠNJENJA OZNAKA I KRATICA:** - (crtica) = nema podataka/nije određivano; ↓ = smanjenje/sniženje prema kontroli; ↑ = povećanje/povišenje prema kontroli; ↔ = nema učinka; odbijanje (*weaning*) = odbijanje mladunaca od dojenja (najčešće 21. dan nakon okoćenja); tj. = tjedan; t. m. = tjelesna masa; okoć. = okoćenja; uk.= ukupno;

\*Napomena: to je općenito rijedak način izlaganja pokusnih glodavaca tijekom skotnosti jer nosi opasnosti od ozljeđivanja i stresa što može izazvati neželjene posljedice na ishod graviditeta.